

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

**Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології**

До захисту допущено:
Завідувач кафедри
_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК
« ____ » _____ 2020 р.

**Дипломний проект
на здобуття ступеня бакалавра
за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
на тему: «Технологія виробництва інсуліну рекомбінантного у картриджах.
Дільниця підготовки посівного матеріалу»**

Виконала:

студентка IV курсу, групи БТ-61
Лемішко Юлія Костянтинівна _____

Керівник:

Асистент, к.т.н.,
Карпенко Юрій Володимирович _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення
технологічного процесу:

доц. каф. біотехніки та інженерії
Шибецький Владислав Юрійович _____

Рецензент:

доц. каф. екобіотехнології та біоенергетики, к.т.н.,
Щурська Катерина Олександрівна _____

Засвідчую, що у цьому дипломному
проекті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.

Студентка _____

Київ – 2020 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЕКТУ

№ з/п	Формат	Позначення	Найменування	Кількість листів	Примітка
1	A4		Завдання на дипломний проект	2	
2	A4	ДП 6113. 00.000 ПЗ	Пояснювальна записка	108	
3	A1	ДП 6113. 01.000 ТК	Технологічна схема	1	
4	A1	ДП 6113. 02.000 ТК	Апаратурна схема	2	
5	A1	ДП 6113. 03.000 ТК	Ферментер	1	

					ДП 6113 00.000.00		
		ПІБ	Підпис	Дата			
Розробив	Лемішко Ю.К.			ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЕКТУ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Керівн.	Карпенко Ю.В.					1	
Консульт.					КПІ ім. Ізоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-61		
Н/контр.							
Зав. Каф.	Тодосійчук Т.С.						

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«27» лютого 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проект студенту

Лемішко Юлії Костянтинівни

1.Тема проекту “Технологія виробництва інсуліну рекомбінантного у картриджах. Дільниця підготовки посівного матеріалу”, керівник проекту Карпенко Юрій Володимирович, к.т.н., ас., затверджені наказом по університету від «21» травня 2020 р. № 1125-с

2. Термін подання студентом проекту « » 2020 р.

3. Вихідні дані до проекту: процес – культивування посівного матеріалу, продуцент – *E.coli*, об’єм ферментеру – 0,16 м³, температура культивування – 36,5±0,5°C, рН 6,7-7,1; рО₂=40±15%, аерація 2 л/хв, τ = 8-12 год, мішалка – відкрита турбінна, внесення індуктора IPTG, кінцева оптична густина *E.coli* – 5-7 од., робочий тиск в апараті – до 0,3 МПа, метод виділення проінсуліну – дезінтеграція клітин і центрифугуванням, метод очистки інсуліну – іоннообмінна та вискоефективна рідинна хроматографія, ступінь очистки інсуліну не менше 98-99%, вміст бактеріальних пептидів і проінсуліну 10 ppM, вихід проінсуліну складає 3 г/л поживного середовища.

4. Зміст пояснювальної записки: обґрунтувати вибір промислового продуценту для культивування, дати характеристику біологічного агента, провести аналіз біохімічних основ виробництва, описати методи отримання промислових

продуцентів, розробити типову принципову технологічну схему, надати розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу, розробити апаратурну схему виробництва та креслення апарату.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслень, гістограм, діаграм, таблиць, плакатів, тощо) технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 2 арк. А1, креслення апарату – 1 арк. А1.

6. Консультанти розділів проекту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Шибєцький В.Ю. доц. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проекту	Термін виконання етапів проекту	Примітка
1	Вступ. Характеристика біологічного агента. Біохімічні основи виробництва.	15.04.20	
2	Методи отримання промислових продуцентів. Розрахунок обладнання	30.04.20	
3	Креслення технологічної та апаратурної схем.	30.05.20	
4	Оформлення пояснювальної записки і схем.	08.06.20	

Студент

_____ Юлія ЛЕМІШКО

Керівник

_____ Юрій КАРПЕНКО

**Пояснювальна записка
до дипломного проекту
на тему: «Технологія виробництва інсуліну
рекомбінантного у картриджах. Дільниця підготовки
посівного матеріалу»**

Київ – 2020 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проект викладено на 109 сторінках друкованого тексту. Складається зі списку скорочень, вступу, п'ятьох розділів, висновків, переліку посилань, 20 рисунків, 4 таблиць, 63 посилань, 4 креслення.

Метою дипломного проекту є розробка технології отримання інсуліну рекомбінантного за допомогою штаму-продуценту *E. coli* JM 109 з плазмідною рHINS05 та проектування стадії підготовки посівного матеріалу.

Запропонована технологія з оптимальними параметрами культивування посівного матеріалу для збільшення виходу та покращення рівня чистоти кінцевого продукту.

Перевагою даної технології є отримання цільового продукту з відносно недорогої сировини, використання сучасної апаратури та майже повна автоматизація технологічного процесу.

Розроблено технологічну, апаратурну схему та креслення апарату. Виконано технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки ферментеру для підготовки посівного матеріалу.

ESCHERICHIA COLI JM109/pHINS05, ІНСУЛІН ЛЮДИНИ
РЕКОМБІНАНТНИЙ, ГЕННА ІНЖЕНЕРІЯ, КУЛЬТИВУВАННЯ,
РЕКОМБІНАНТНІ БІЛКИ

SUMMARY

The diploma project is presented on 109 pages of printed text. It consists of a list of abbreviations, introduction, five sections, conclusions, list of references, 20 figures, 4 tables, 63 references, 4 drawings.

The aim of the diploma project is to develop a technology for obtaining recombinant insulin using a producer strain of *E. coli* JM 109 with plasmid pHINS05 and design the stage of inoculum preparation site.

The technology with the optimal parameters of seed cultivation is proposed to increase the yield and improve the purity of the final product.

The advantage of this technology is to obtain the target product from relatively inexpensive raw materials, the use of modern equipment and almost complete automation of the technological process.

The technological, hardware scheme and drawings of the device are developed. Technological, constructive and thermal calculations of the fermenter for seed preparation are made.

ESCHERICHIA COLI JM109 / pHINS05, HUMAN INSULIN RECOMBINANT,
GENE ENGINEERING, CULTIVATION, RECOMBINANT PROTEINS

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	10
ВСТУП	11
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	13
1.1. Основні промислові продуценти інсуліну	13
1.2. Систематичне положення	16
1.3. Морфолого-цитологічні ознаки	17
1.4. Культуральні ознаки	19
1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки	20
1.6. Поширення в природі	21
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 1	22
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	23
2.1. Характеристика кінцевого продукту	23
2.2. Схема хімічних перетворень	26
2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології	32
2.4. Методи очистки цільового продукту	33
2.5. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси	35
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 2	38
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	39
3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту	39
3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту	41
3.2.1. Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів	41

					<i>ДП 6113. 00.000 ПЗ</i>			
		<i>ПІБ</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>	<i>Лемішко Ю.К.</i>				<i>ЗМІСТ</i>	<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Керівн.</i>	<i>Карпенко Ю.В.</i>						<i>7</i>	
<i>Консульт.</i>						<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ</i>		
<i>Н/контр.</i>								
<i>Зав. Каф.</i>	<i>Тодосійчук Т.С.</i>							

3.2.2. Використання індукованого мутагенезу	42
3.2.3. Використання гібридизації для створення промислових продуцентів біологічно-активних речовин	43
3.2.4. Регуляція метаболізму у мікробній клітині	44
3.2.5. Використання методів генної та клітинної інженерії	44
3.3. Схема отримання продуцента, що використовується в роботі	45
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3.....	49
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	50
4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва.....	50
4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві	52
4.3. Опис технологічного процесу	56
4.4. Матеріальний баланс	71
4.5. Контроль виробництва	73
4.6. Технологічна схема виробництва	79
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 4.....	80
РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	81
5.1. Обґрунтування обраної конструкції ферментера. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату	81
5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки	87
5.2.1. Конструктивний розрахунок	87
5.2.2. Розрахунок перемішуючих пристроїв	88
5.2.3. Розрахунок воронки	89
5.2.4. Розрахунок барботера.....	90
5.2.5. Тепловий розрахунок	91
5.3. Вибір загальнозаводського обладнання	94
5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища	98

ВИСНОВКИ.....	101
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	102

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		9

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

IGF1	– інсуліноподібний фактор росту
CSF	– колонієстимулюючий фактор
KGF	– фактор росту кератиноцитів
TNF	– фактор некрозу пухлин
МПБ	– м'ясопептонний бульйон
МПА	– м'ясопептонний агар
EMC	– середовище Левіна
SRP	– цитозольний шаперон
IAPP	– острівковий амілоїдний пептид
ІФ ₃	– інозитол-трифосфат
АКТГ	– фдренотропний гормон
АС	– апаратурна схема
ТС	– технологічна схема
МО	– міжнародна одиниця
ММ	– молекулярна маса
АФІ	– активний фармацевтичний інгредієнт
IPGT	– 1-ізопропіл-β-D-тіогалактопіранозид
ЕДТА	– етилендіамінтетрауксусна кислота
ГДК	– гранично допустима концентрація
LAL-тест	– хромогенний тест
ДР	– допоміжні роботи
ТП	– технологічний процес
ВЕРХ	– високоефективна рідинна хроматографія
ОГ (OD)	– оптична густина
ТВ	– тільки-включення

ВСТУП

Інсулін є найважливішим анаболічним гормоном, який полегшує проникнення глюкози в клітини, стимулює використання її тканинами за рахунок прискорення гексокіназної або глюкокіназної реакції, сприяє перетворенню глюкози в глікоген; крім нормалізації вуглеводного обміну дає ряд інших метаболічних ефектів: посилює утворенню жиру, стимулює синтез поліпептидів, зменшує розпад білків. В людському організмі синтез інсуліну здійснюється в β -клітинах острівців Лангерганса підшлункової залози. При порушенні продукування даного гормону виникає складне захворювання – цукровий діабет. Єдиним способом для підтримки життя та працездатності людей, хворих на цукровий діабет, є обов’язковий комплексний прийом антидіабетичних препаратів.

За підрахунками ВООЗ на сьогоднішній день у всьому світі на цукровий діабет хворіє приблизно 420 мільйонів людей. За останні 40 років число хворих зросло в чотири рази, при цьому збільшуючись у країнах світу на 5-7% щорічно, а кожні 13-15 років стає вдвічі більшою. В Україні наразі налічується понад два мільйони людей, хворих на цукровий діабет, але як впевнені лікарі, офіційні дані на рахунок кількості хворих відрізняються від реальної картини як мінімум втричі.

На теперішній час інсулін виробляють двома способами:

- біосинтетичним (за допомогою клітин кишкової палички та пивних дріжджів);
- з підшлункової залози худоби (в основному свиней або ВРХ).

Більш ефективним є генно-інженерний метод, який займає близько 70% від загального об’єму виробництва інсуліну, так як не потребує дорогої сировини, а використовує рекомбінантні штами мікроорганізмів. В Україні існує два найвідоміші виробники субстанцій інсуліну: “Індар” та “Фармак”. Але цього недостатньо, щоб забезпечити все вітчизняне виробництво, тому країна залежна від зарубіжних виробників (“Novo Nordisk” (Данія), “Eli Lilly” (Франція),

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
						11
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

“Sanofi” (Франція)). Тому виробництво субстанції інсуліну рекомбінантного в картриджах є актуальним для нашої країни.

Метою дипломного проекту є модернізація технології отримання інсуліну рекомбінантного за допомогою штаму-продуцента *Escherichia coli* JM 109 з плазмідною рHINS05 для збільшення виходу та покращення рівня чистоти кінцевого продукту.

Для досягнення мети розглянемо наступні завдання:

- обрати та дати характеристику промислового продуцента рекомбінантного інсуліну;
- розглянути основні морфолого-цитологічні, культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки даного продуцента;
- провести аналіз основних методів отримання продуцента та запропонувати схему отримання продуцента на основі даних;
- дати характеристику та способи отримання кінцевого продукту;
- скласти матеріальний баланс, обрати апаратну та технологічну схему виробництва рекомбінантного інсуліну;
- обґрунтувати вибір конструкції апарату, здійснити технологічний та конструктивний розрахунок ферментеру з механічним перемішувачем;

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
						12
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1. Основні промислові продуценти інсуліну

Відкриття інсуліну в 1922 році ознаменувало собою значний прорив в медицині і терапії у пацієнтів з діабетом. Можливість експресії гетерологічних генів в клітинах *Escherichia coli* була продемонстрована більш ніж 40 років тому (Cohen et al., 1973). Початком ери біофармацевтичних препаратів можна вважати 1982 рік, коли компанія «Eli Lilly» (США) почала виробництво препарату Humulin® (рекомбінантного інсуліну людини). У 1978 році Девід Геддель і його колеги (з Genentech) отримали першу рекомбінантну ДНК людського інсуліну, використовуючи і комбінуючи А- і В-ланцюги інсуліну, експресовані в *E. coli*. Інсулін, який отримують з підшлункової залози тварин, трансформують в людський внаслідок синтетичних методів, але більш використовуваним і сучасним є інсулін, вироблений за допомогою рекомбінантних штамів мікроорганізмів.

На ринку представлено більше 300 біофармацевтичних продуктів, що включають терапевтичні білки та антитіла. Біофармацевтичні препарати, затверджені Управлінням з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів США (FDA) та Європейським агентством за медичними засобами (EMA) з 2004 року по 2013 рік, головним чином отримані з клітин ссавців (56%); за допомогою кишкової палички (24%); *S. cerevisiae* (13%); трансгенні тваринні та рослинні (3%) та клітини комах (4%). В даний час інсулін виробляється переважно з *E.coli* та *S. cerevisiae* для лікування хворих діабетом [1].

На сьогодні вже розроблена методологія експресії гена проінсуліну людини в клітинах *E. coli*. При цьому найчастіше використовують штами даних продуцентів: *E. coli* JM109, *E. coli* HB101, *E. coli* TG1, *E. coli* TG2 і *E. coli* BL21.

					ДП 6113. 00.000 ПЗ					
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата						
Розробив		Лемішко Ю.К.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА		Стадія		Аркуш	Аркушів
Консульт.								13		
				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ						
Керівник		Карпенко Ю.В.								
Затверд.										

Сам метод полягає в біосинтезі клітинами бактерій проінсуліну у складі гібридних білків у вигляді нерозчинних “тілець включення”. Гібридний білок забезпечує резистентність щодо дії протеолітичних ферментів клітин і ефективно відщеплення лідерної послідовності від проінсуліну людини. Бактеріальна система експресії на основі *E. coli* є економічно ефективною та найбільш застосовуваною, має ряд переваг: низька вартість, високі рівні експресії, прості умови культивування, швидкий ріст, відсутність ендотоксинів та ін. Проте, є деякі недоліки при використанні даної системи експресії, такі як: втрата властивостей плазмід, непотрібні індуктори для експресії генів, внутрішньоклітинне накопичення гетерологічних білків як тілець включення, відсутність посттрансляційних модифікацій та ін. [2].

Незважаючи на зазначені недоліки, *E. coli* як і раніше використовують для отримання гетерологічних білків, основну частину яких складають білки людини, що використовуються в якості лікарських профілактичних препаратів – гормони (інсулін, інсуліноподібний фактор росту - IGF1, гормон росту, еритропоетин); фактори росту (колонієстимулюючий фактор - CSF, фактор росту кератиноцитів - KGF), цитокіни (ІФН- α , ІФН- β , ІФН- γ ; ІЛ-1, ІЛ-6, фактор некрозу пухлини-TNF), ферменти і їх інгібітори та ін [2].

Так як перший рекомбінантний інсулін був отриманий в *E. coli* при використанні підходу, що мав на увазі експресію хімічно синтезованої ДНК, то після даної експресії два ланцюги очищають і разом інкубують при певних умовах, які сприяють створенню інтактного і біологічно активного інсуліну. Інший підхід – це експресія єдиної хімічно синтезованої ДНК, що кодує проінсулін людини в *E. coli* з подальшим очищенням і видаленням С-пептиду за допомогою протеолітичного розщеплення. Цей підхід більш ефективний і зручніший для великотонажного виробництва і комерційно використовувався з 1986 року [3]. Елі Ліллі слідував цій технології для виробництва Humulin, першого рекомбінантного інсуліну, схваленого в 1982 році, для лікування пацієнтів з діабетом. Ці рекомбінантні інсуліни першого покоління мають

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
						14
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

амінокислотну послідовність, ідентичну нативному людському інсуліну. Було відзначено, що нативний інсулін в комерційних препаратах зазвичай існує в олігомерної формі, але в крові біологічно активний інсулін перебуває в мономерної формі. “Lispro”, розроблений Eli Lilly, був першим швидкодіючим аналогом інсуліну, який отримав нормативне схвалення в 1996 році для терапевтичного застосування [3]. Ще один швидкодіючий аналог інсуліну, що виробляється за допомогою кишкової палички “Glulisine” (Apidra), який був розроблений Aventis Pharmaceuticals і схвалений регулюючими органами США в 2004 році.

Також рекомбінантний людський інсулін часто виробляють за допомогою клітин *Saccharomyces cerevisiae* починаючи з 1980 року (13%). Для ефективної експресії і секреції рекомбінантного проінсуліну в дріжджах була розроблена конструкція інсуліну, що містить нативний А-ланцюг і В-ланцюг без С-кінцевого треоніну В₃₀, або безпосередньо злиті, або пов'язані з допомогою короткого синтетичного С-пептиду. Послідовність ДНК, що кодує цю конструкцію, була злита з сигнальної послідовністю α -фактора *S. cerevisiae* для секретуємої експресії проінсуліну, яка давала вихід до 80 мг / мл інсуліну. Одноланцюговий проінсулін очищали і перетворювали в активний інсулін за допомогою трипсин-опосередкованої реакції транспептидації в присутності складного ефіру треоніну [4]. Інсулін “Aspart” є другим швидкодіючим аналогом інсуліну, який був вироблений з *S. cerevisiae*, розроблений Novo Nordisk і схвалений FDA США в 2001 році для терапевтичного застосування для людини. Інсулін “Aspart” був отриманий шляхом заміни пролінових залишків в положенні 28 аспарагінової кислотою в В-ланцюзі. Ця генетична модифікація призвела до збільшення відштовхування між ланцюгами, зниження самоасоціації і, отже, до збільшення швидкості проникнення в кров з місця підшкірної ін'єкції [5].

Інсулін “Detemir” є іншим рекомбінантним аналогом інсуліну тривалої дії, який був комерційно вироблений з *S. cerevisiae*, розроблений Novo Nordisk і схвалений для застосування у людей в 2004 році Європейськими регулюючими

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		15

органами. Рекомбінантний “Detemir” отримували шляхом видалення залишку треоніну в положенні 30 В-ланцюга і ланцюга жирних кислот C14, ковалентно приєднаного до залишку лізину в положенні 29 В-ланцюга. Ці генетичні зміни призвели до зв'язування інсуліну з альбуміном в плазмі, що забезпечило повільне і постійне виділення інсуліну і, таким чином, продовжило його дію до 24 годин [6].

Також достатньо продуктивним є альтернативний штам дріжджів *Pichia pastoris*, але на даний час він ще вивчається. Основна відмінність дріжджів *P. pastoris* від дріжджів *S. cerevisiae* заключається в тому, що метилотрофні дріжджі являються аеробними організмами, а дріжджі сахароміцети відносяться до факультативних анаеробів [7]. Відомо, що даний штам має дуже високий рівень експресії гетеролітичних білків, що перевищує рівень у *S. cerevisiae*. Тому дріжджі цього штаму можуть бути привабливою альтернативою для великомасштабного виробництва рекомбінантних аналогів інсуліну [8].

Підсумовуючи все вищесказане, можна зробити висновок, що *E. coli* була і залишається один з найкращих продуцентів для виробництва рекомбінантного інсуліну шляхом свого швидкого росту, високою продуктивністю та добре вивченому геному.

1.2 Систематичне положення

Таблиця 1.1. Систематичне положення *E. coli*

Царство	Bacteria
Тип	Proteobacteria
Клас	Gamma Proteobacteria
Ряд	Enterobacteriales
Родина	Enterobacteriaceae
Рід	Escherichia
Вид	Escherichia coli

За визначником Берджі *E. coli* відноситься до п'ятої групи (факультативно анаеробні грамнегативні палички), підгрупа 1 (сімейство Enterobacteriaceae), рід *Escherichia*, вид *Escherichia coli* [9].

1.3. Морфолого-цитологічні ознаки

Кишкова паличка або *E. coli*, яка була відкрита німецьким мікробіологом Теодором Ешеріхом являється однією з найбільш досліджених видів бактерій, які живуть в нижньому відділі кишечника ссавців. Клітини *E. coli* паличкоподібні, мають заокруглені кінці розміром $0,4 - 0,8 \times 1 - 3$ мкм, об'єм клітини приблизно $0,6-0,7$ мкм³. Дана бактерія є грамнегативною, факультативний анаероб, через це не утворює спори. Кишкова паличка - рухлива бактерія, переміщення якої здійснюється за допомогою джгутиків, які розташовані перетрихально [10]. Джгутик являє собою відносно жорстку спіраль, що складається тільки з одного білку – флагелігу. Відростки іншого виду (фімбрії, війки або пілі) спостерігаються на поверхні бактерій *E. coli* JM 109. Такі ворсинки побудовані також тільки з одного виду білка, в даному випадку – піліну. Вони являють собою прямолінійні білкові відростки круглого поперечного перерізу.

На ультратонких зрізах у деяких штамів *E. coli* на поверхні клітини виявляється мікрокапсула. Частіше буває, що мікрокапсула не виявлена, а поверхня клітинної стінки гладка або шорстка [10]. Клітинна стінка бактерії достатньо міцна і дозволяє клітині зберігати форму, через наявність в ній муреїну – молекули, побудованої з паралельних полісахаридних ланцюгів, перехресно з'єднаних через регулярні інтервали короткими ланцюгами амінокислот. Муреїновий шар (товщина 2-3 нм) у цих бактерій зовні покритий гладким тонким мембраноподібним шаром ліпідів і полісахаридів, що захищають клітину від дії лізоциму. Ліпідно-полісахаридний шар (товщина 7 нм) обумовлює також стійкість грамнегативної бактерії до пеніциліну. Також наявна плазматична мембрана (товщина 7 нм), яка слугує місцем локалізації дихальних ферментів. В цитоплазмі бактерій були виявлені 70S рибосоми (велика і мала субодиниці 50S

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		17

і 30S, відповідно). Також наявні дрібні включення, такі як ліпіди глікоген та ін [11]. Детальнішу будову можна спостерігати на рисунку 1.3.1.

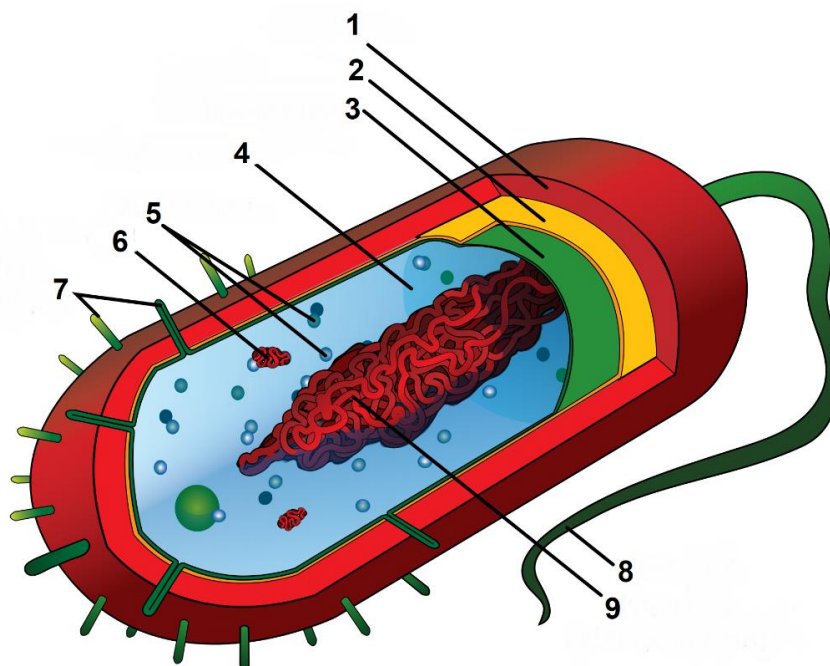


Рисунок 1.3.1. Будова *E. coli* [11]

1 – капсула, 2 – клітинна стінка, 3 – плазмалема, 4 – цитоплазма, 5 – рибосоми, 6 – плазмід, 7 – пілі(фімбрії), 8 – джгутик, 9 – нуклеоїд.

Нуклеоїд зазвичай чітко відмежований від решти цитоплазми і заповнений фібрилами ДНК. ДНК кишкової палички є ковалентно замкненим дволанцюговим кільцем з м.м. $1,9 \cdot 10^9$ (або, за іншими даними, $26 \cdot 10^9$) Д. Молекула ДНК виконує роль функціонально активної хромосоми, тому її частіше називають нуклеоїд. Оскільки відстань між парами азотистих основ в ДНК *E. coli* становить близько 3,4 Å, то контурна довжина молекули ДНК бактерії становить близько 0,4 см, що перевищує довжину самої клітини приблизно в 600 разів, а діаметр лише 20 Å (діаметр одиночної клітини *E. coli* дорівнює близько 0,75). Тому вважають, що хромосома (ДНК) усередині бактерій цього виду існує у вигляді «згорнутого геному», що займає 1/6 об'єму клітини, тобто в згорнутій (скрученій) формі у вигляді близько 50 петель, кожна з яких знаходиться в скрученій формі. Оскільки «згорнутий геном» можна

дестабілізувати обробкою рибонуклеазою, то вважають, що в його склад входить також і РНК [12].

1.4. Культуральні ознаки

Культура *E. coli* є невибагливою до поживного середовища та його складу, тому вона легко розвивається на простих середовищах, таких як м'ясопептонний бульйон (МПБ), при цьому спостерігається ріст зі значним рівномірним помутнінням середовища. Дає невеликий осад сірого кольору, який легко зруйнувати. Також росте на м'ясопептонному агарі (МПА), при цьому колонії бактерій зазвичай мають округлу форму сіруватого кольору, із однорідною структурою, з рівною поверхнею колонії та рівними краями, пігментація не спостерігається, консистенція пастоподібна, легко емульгують.

На щільних середовищах утворює колонії в S- і R-формах. Колонії в S-формі гладенькі, блискучі, напівпрозорі. На рідких середовищах утворює дифузне помутніння та придонний осад. Для ідентифікації *E. coli* використовують диференціально-діагностичні середовища, що містять лактозу та різні індикатори. На середовищі Ендо колонії мають малиновий колір з металевим блиском (рис 1.4.1), на середовищі ЕМС(Левіна) – темно-фіолетовий колір (рис 1.4.2.), на середовищі Плоскірева – червоний колір [13].

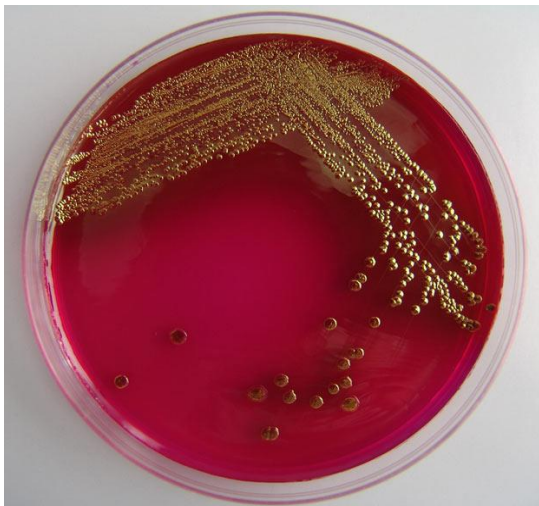


Рис 1.4.1. Колонії *E. coli* на середовищі Ендо [13]



Рис 1.4.2. Колонії *E. coli* на середовищі Левіна [13]

Фізіологічно *E. coli* є універсальним і добре адаптованим щодо характерних місць перебування мікроорганізму. Він може рости в середовищі з глюкозою в якості єдиної органічної речовини. Для *E. coli* дикого типу глюкоза є єдиним фактором росту і може метаболічно перетворюватись на всі макромолекулярні компоненти, які необхідні для бактерії.

Кишкова паличка має складну антигенну структуру. Близько 171 серогруп визначаються соматичним О-антигеном; капсульний К-антиген має три різновиди: А, В і L, які відмінні за чутливістю до температури і хімічних речовин. Відомо більше 57 сероварів, що детерміновані джгутиковим Н-антигеном. О-антигени мають ідентичну хімічну структуру та зв'язані ліпосахаридами клітинної стінки. К-антигени можна виявити тільки під час кип'ятіння культури [13].

1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки

E. coli можуть рости у присутності або відсутності O_2 . В анаеробних умовах вона використовує бродіння, утворюючи характерні “суміші кислоти і газу” як кінцевого продукту. Може рости також за рахунок енергії анаеробного дихання, оскільки здатна використовувати NO_3 , NO_2 або фумарат як кінцевий акцептор електронів у дихальному ланцюгу переносу електронів. Ця здатність дозволяє кишкової паличці адаптуватися за умови проживання у кишечнику, так і в різних умовах зовнішнього середовища [13]. Являється мезофілом, оптимальна температура росту 30-37°C, деякі штами можуть ділитися при температурі до 49°C. Найкраще росте в середовищах, де значення рН близьке до нейтрального 6,8 - 7,2, якщо нижче 4, то загине. До складу клітинної стінки входить одношаровий муреїн, ліпопротеїди, фосфоліпіди, ліпополісахариди та діамінополімелінова кислота. Відносно типу живлення – хемоорганогетеротроф. Клітини *E. coli* діляться шляхом перетяжки, так само як і клітини інших грамнегативних бактерій. На початкових стадіях поділу клітини відбувається перешнуровка нуклеотиду і утворення петлеподібних інвагінатів цитоплазматичної мембрани в місці майбутньої перетяжки. В клітинному циклі

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
						20
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

бактерії можна виділити такі етапи [14]:

1. Період В – фаза, в якій відбувається ріст і збільшення маси клітини після попереднього ділення;
2. Період С – реплікація генетичного матеріалу;
3. Період Д – розходження дочірніх хромосом і ділення клітини.

Має високу ферментативну активність щодо сорбіту, лізину, сахарози. Ферментує глюкозу, мальтозу, маніт та лактозу з утворенням кислоти та газу. Культура *E. coli* здатна до адгезивної активності та не спроможна розріджувати желатин, гідролізувати сечовину та гемолітичну активність.

E. coli може рости на різних середовищах, таких як лізогенний бульйон або будь-яке інше середовище, яке має глюкозу, одноосновний фосфат амонію, хлорид натрію, сульфат магнію, амінокровін, гідролізат казеїну та воду. Ріст може бути викликаний аеробним або анаеробним диханням з використанням великої різноманітності окисно-відновних пар, включаючи окислення піровиноградної кислоти, мурашиної кислоти, водню і амінокислот. Не потребує додаткових факторів росту [14].

1.6. Поширення в природі

Залежно від патогенності, розрізняють умовно-патогенні і патогенні *E. coli*. Кишкова паличка є постійним мешканцем товстого кишечника, який відіграє важливу роль у регуляції гомеостазу макроорганізму. Вона продукує велику кількість біологічно активних речовин: низькомолекулярні пептиди, що є засобом міжклітинної комунікації, антагоністичні низькомолекулярні білки – мікроцини, високомолекулярні – коліцини, вітаміни К та ряд вітамінів В, а також запобігає розвитку патогенних мікроорганізмів в кишечнику. Вона забирає з просвіту кишечника кисень, який являється шкідливим для біфідо- і лакто-бактерій нашої мікрофлори.

У ґрунті, воді вони зберігаються протягом 2–3 міс, а в молоці та інших харчових продуктах не тільки зберігаються, а й розмножуються. *E. coli* чутливі

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
						21
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

до високої температури, дезінфектантів. Пряме сонячне світло та температура

100 °C вбивають бактерії за лічені хвилини, а при температурі 60°C ще здатні жити протягом 15 хвилин. *E. coli* може реагувати на екологічні сигнали, такі як хімічні речовини (феноли, формалін та їдкий натрій), температура, осмолярність, рН [15].

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 1

E. coli є найкращою бактерією для біосинтезу рекомбінантного інсуліну, так як має ряд переваг: добре вивчений геном, швидкий ріст та високий рівень експресії. Вона являється грам-негативною, паличкоподібною та рухливою бактерією, яка є невибагливою до поживного середовища, має ДНК у вигляді скрученого геному та для ідентифікації *E. coli* використовують середовища, що містять лактозу та різні індикатори. На МПБ росте з помутнінням середовища, на МПА – округлі колонії сіруватого кольору. На середовищі Ендо – малиновий колір з металевим блиском, на ЕМС – темно-фіолетовий колір, а на середовищі Плоскірева – червоний колір.

E. coli є факультативний анаеробом, тобто може рости у присутності або відсутності O₂. Також являється мезофілом і розвивається при температурі 30-37°C, а значення рН близьке до нейтрального 6,8 - 7,2. Кишкова паличка є постійним мешканцем товстого кишечника, її функція – забирати з просвіту кишечника кисень, який являється шкідливим для біфідо- і лакто-бактерій нашої мікрофлори. Чутлива до прямого сонячного світла, високої температури, рН та хімічні речовини.

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
						22
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1. Характеристика кінцевого продукту

Інсулін - гормон, який регулює рівень цукру в крові, який виробляється в острівцях Лангерганса в підшлунковій залозі. Інсулін виділяється при підвищенні рівня глюкози в крові - наприклад після прийому їжі. Коли рівень глюкози в крові падає, секреція інсуліну припиняється, а печінка вивільняє глюкозу в кров.

Інсулін має кристалічну структуру і зберігається в β -клітинах в щільно згрупованих “гранулах”, які складаються з нерозчинних кристалічних гексамерів інсуліну. Концентрація інсуліну в цих гранулах становить приблизно 40 мМ. Кристали гексамерів інсуліну складаються з 6 молекул інсуліну, згрупованих у вигляді 3 димерів. Після секреції гексамерів у кров концентрація інсуліну падає і в поєднанні з електростатичним відштовхуванням веде до дисоціації гексамерів інсуліну на мономер. Мономер являється активною формою інсуліну, в той час як гексамер – форма зберігання інсуліну.

Інсулін складається з двох поліпептидних ланцюгів, як показано на рисунку 2.1.1. Ланцюг А містить 21 амінокислотний залишок, а ланцюг В – 30 амінокислотних залишків. Між собою ланцюги А і В пов'язані двома дисульфідними (- S - S -) зв'язками. Ще один такий зв'язок є між залишками цистеїну, що знаходяться А-ланцюгу. Загальна стереоструктура молекули підтримується цими трьома дисульфідними зв'язками, і будь-яка зміна в ній веде до зникнення гормональної активності інсуліну [16].

					ДП 6113. 00.000 ПЗ				
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					
Розробив	Лемішко Ю.К.				РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	Стадія	Аркуш	Аркушів	
Консульт.							23		
						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ			
Керівник	Карпенко Ю.В.								
Затверд.									

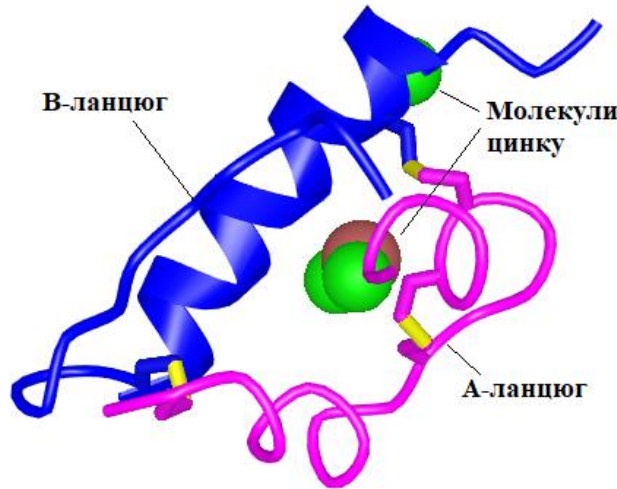


Рис. 2.1.1. Структура молекули інсуліну [17]

Декілька факторів стимулюють секрецію інсуліну, але найважливішим з них є концентрація глюкози в артеріальній крові, яка пронизує острівці. Коли концентрація глюкози в крові збільшується (тобто після прийому їжі), β -клітини поглинають і метаболізують великі кількості глюкози, а секреція інсуліну збільшується. І навпаки, при зниженні концентрації глюкози в крові секреція інсуліну зменшується, але навіть під час голодування виділяється невелика кількість цього гормону. Секреція інсуліну може також стимулюватися певними амінокислотами, жирними кислотами, кетокислотами (продуктами окислення жирних кислот) і декількома гормонами, які виділяються шлунково-кишковим трактом. Секреція інсуліну інгібується за допомогою соматостатину і активацією симпатичної нервової системи [18].

Інсулін в першу чергу стимулює засвоєння глюкози трьома тканинами - жировою, м'язовою та печінковою, які важливі для обміну речовин і зберігання поживних речовин. Як і інші білкові гормони, інсулін зв'язується зі специфічними рецепторами на зовнішній мембрані клітин-мішеней, тим самим

активуючи метаболічні процеси всередині клітин. Ключовою дією інсуліну в цих клітинах є стимулювання транслокації переносників глюкози (молекул, які опосередковують поглинання клітиною глюкози) зсередини клітини в клітинну мембрану [18].

Взагалі інсулін отримують трьома способами: напівсинтетичним(одержують свинячий інсулін ферментативною трансформацією), тваринного походження(свинячий інсулін) та генно-інженерним способом.

Так як інсулін тваринного походження має проблему в дефіциті сировини, інтерес до рекомбінантного інсуліну дедалі більшає. Все через те, що інсулін, який виділений з підшлункової залози свиней відрізняється від інсуліну людини на один амінокислотний залишок. Інсулін великої рогатої худоби - на три. Це означає, що при введенні препарату людина отримує білок (поліпептид) іншої видоспецифічності. Отже, існує певний відсоток випадків прояву алергії. Також при парентеральному введенні (особливо у дітей) може спостерігатися хворобливість. Одночасно доводиться стикатися з проблемою передозування, оскільки в разі алергії інсулін (як антиген) частково нейтралізується і, відповідно, вводити його необхідно більше.

Рекомбінантний інсулін, який синтезується в мікробній клітині, позбавлений зазначених недоліків, оскільки амінокислотна послідовність двох його ланцюгів кодується генами людини. В принципі, він ідентичний інсуліну з людської тканини. Правда, його виділення і очищення вимагають особливої ретельності, так як в цьому випадку необхідно звільнитися від мікробних ліпо- та глікопротеїнів. Їх домішки в рекомбінантному інсуліні внаслідок токсичності можуть викликати небажані побічні ефекти. Однак це вже відноситься до якості окремих серій препарату і культурі виробництва на даному підприємстві [16].

Готові препарати поділяються за тривалістю дії на:

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
						25
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

- Препарати короткої дії. Ефект настає вже через 30 хвилин і може тривати протягом 5-7 год., в залежності від дозування;
- Препарати середньої тривалості дії. Характеризується повільним початком та значною тривалістю дії. Дія препарату настає через 1 годину після введення, тривалість дії може становити 12-20 годин;
- Препарати комбінації середньої та короткої тривалості дії. Характеризується швидким початком та подовженою тривалістю дії. Дія препарату настає через 30-45 хвилин після введення, а тривалість дії може становити 12-16 годин (залежно від дози та індивідуальних особливостей організму) [19].

2.2. Схема хімічних перетворень

В даний час у виробництві рекомбінантного інсуліну конкурують дві принципово різні технології. Згідно першої в клітині мікроорганізму-господаря вводять плазмиду, що містить послідовність нуклеотидів, яка відповідає проінсуліну (ланцюг А, С-пептид, ланцюг В і далі лідерному пептиду і промоторній ділянці). Надалі С-пептид відділяється. Особливість другої - роздільне отримання ланцюга А і ланцюга В у двох мікробних культурах, які згодом об'єднуються [20].

Розглянемо цей процес детальніше. На даний час доведено, що біосинтез і зберігання інсуліну регулюється катіонами цинку та кальцію. Біосинтез відбувається в β -клітинах підшлункової залози із попередників препроінсуліну і проінсуліну. Попередник інсуліну при його біосинтезі в тканині, так званий проінсулін, містить ще один поліпептидний ланцюг (пептид С). Пізніше цей ланцюг відділяється від зрілої (завершеної) форми гормону, однак при виділенні інсуліну з тваринних клітин від домішок проінсуліну позбутися важко. Якраз в пептиді С видові відмінності амінокислотної послідовності набагато більш великі

(у порівнянні з самим інсуліном), тобто побічні ефекти інсуліну тваринного походження в значній мірі обумовлені «чужим» пептидом.

Секретуємий інсулін складається з 51 амінокислоти, має молекулярну масу 5,8кДа. В свою чергу ген препроінсуліну кодує попередник із 110 імнокислот. Як і у випадку інших процесах секреції білків, препроінсулін має гідрофобний N-кінцевий сигнальний пептид, який взаємодіє з цитозольними шаперонами (SRP). SRP полегшують транслокацію препроінсуліну через мембрану шорсткого ендоплазматичного ретикулума [21].

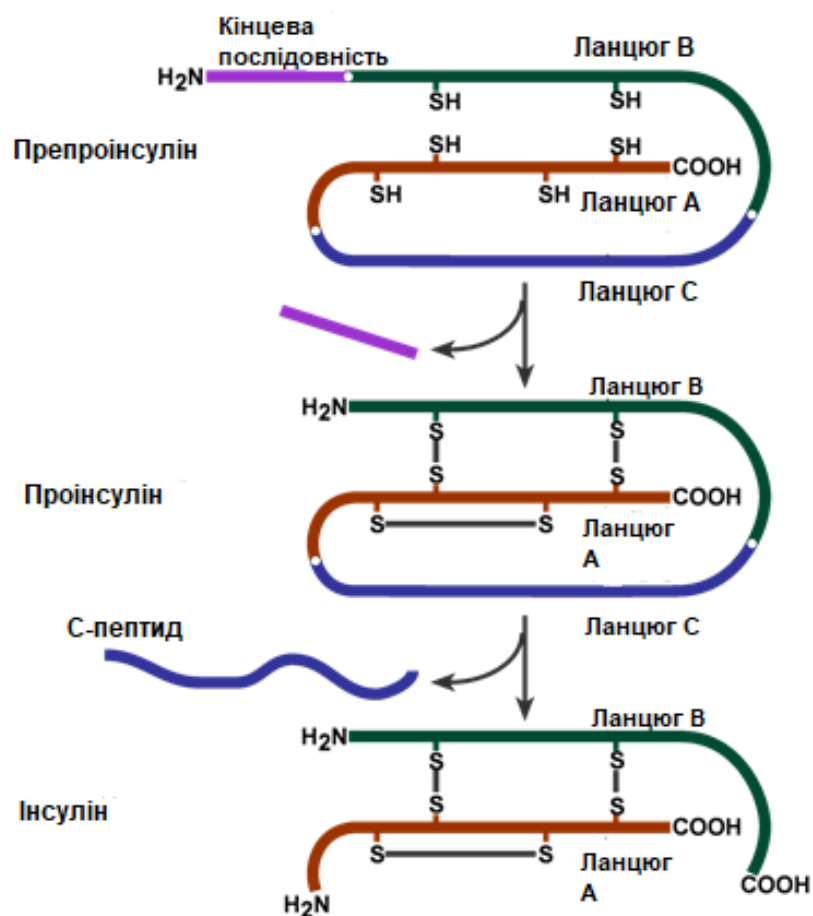


Рис. 2.2.1. Біосинтез інсуліну [20]

Цей процес відбувається за допомогою пептидних каналів, в яких сигнальний пептид відщеплюється від препроінсуліну за допомогою сигнальної пептидази і утворює проінсулін. Потім проінсулін піддається фолдингу. Після утворення тривимірної конформації проінсулін транспортується в комплекс

Гольджі, де поступає в незрілі секреторні везикули. В секреторних везикулах після відщеплення С-пептиду трипсин- і карбоксипептидазо-подібними ферментами перетворюється в гексамер інсуліна (рис 2.2.2.). Видалення С-пептиду повністю змінює розчинність гексамеру і викликає кристалізацію в везикулах. Інсулін та С-пептид зберігаються в цих секреторних гранулах разом з острівковими амілоїдним пептидом (ІАРР або амілін) і іншими менш розповсюдженими продуктами секреції β -клітин.

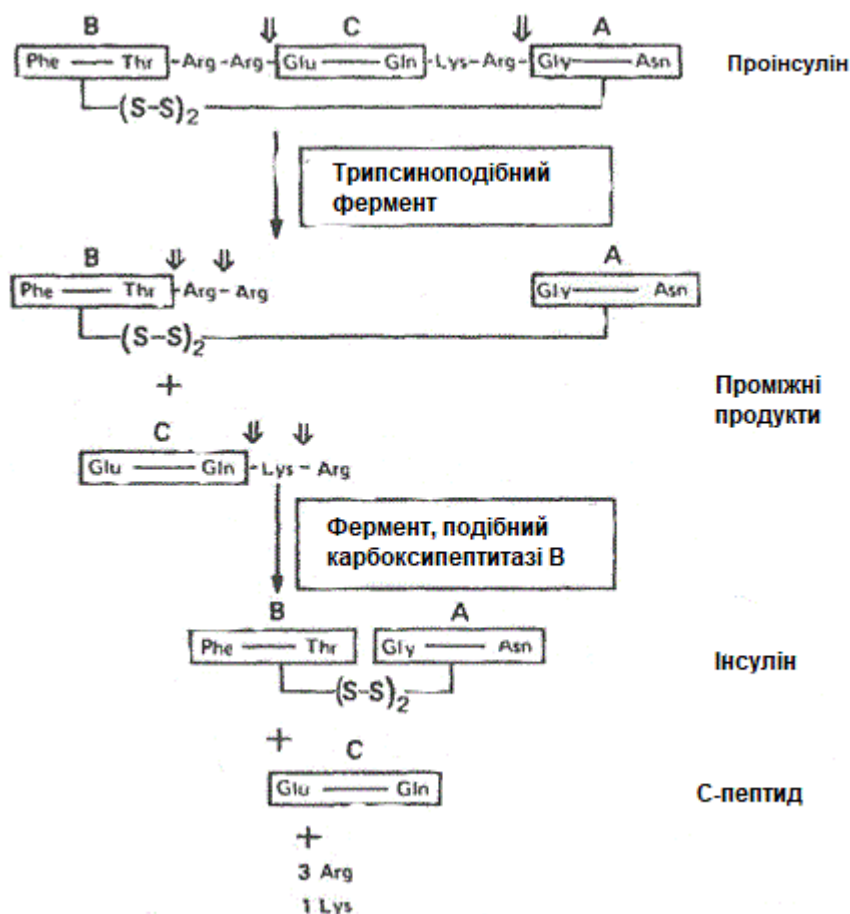


Рис 2.2.2. Стадія утворення інсуліну з проінсуліну [21].

У лабораторії однієї із закордонних фірм розроблена схема отримання рекомбінантного інсуліну, заснована на роздільному біосинтезі двох його ланцюгів; кожен ланцюг синтезується в окремій культурі *E. coli*. Попередньо на основі плазмід конструювалися вектори (один - для гену ланцюга А, інший – для гену ланцюга В). До кожної послідовності приєднувався триплет, який відповідав

метіоніну і нуклеотидам гену індукцйбельного ферменту бетагалактозидази, включаючи оперон. Таким чином, між нуклеотидними послідовностями ланцюгів А, В і бетагалактозидазою опинявся метіоніновий триплет. Ця обставина є дуже важливою для завершальної стадії роботи. Ферментація двох культур з вектором, що несе ланцюг А, і вектором, що несе ланцюг В, проводилася на середовищі з лактозою (індуктором синтезу бетагалактозидази). Якщо не розщепити глюкозу, то вона може бути використана організмом як джерело енергії. Оскільки бетагалактозидаза і ланцюг А (або В) мали в векторі загальний промотор, накопичення бетагалактозидази супроводжувалося накопиченням великої кількості пов'язаної з нею ланцюгів А (В). Після закінчення ферментації з двох культур виділялися два білка: ланцюг А плюс бетагалактозидаза і ланцюг В плюс бетагалактозидаза. Метіоніновий залишок, що зв'язує кожен інсуліновий ланцюг з бетагалактозидазою, руйнувався за допомогою BrCN, а інсулінові ланцюги при цьому звільнялися і виділялися [21].

На останньому (чисто хімічному) етапі роботи відбувалося об'єднання ланцюгів А і В у молекулу інсуліну (за рахунок двох дисульфідних зв'язків, а третій дисульфідний зв'язок формується між залишками цистеїну в ланцюзі А).

Регуляція біосинтезу інсуліну. Біосинтез інсуліну регулюється як на транскрипційному, так і на трансляційному рівнях. В β -клітинах зберігається приблизно 13 000 гранул інсуліну. Вони займають більше 10% від загального об'єму клітини. Кожна гранула містить приблизно 200 000 молекул інсуліну. Здатність β -клітин швидко реагувати на клітинні сигнали, як правило, зв'язана з регуляцією транскрипції. Ряд дискретних елементів, послідовності в промоторній області гену інсуліну, названі А, С, Е, Z, CRE елементами, визначають локалізацію інсуліну в β -клітинах, а також слугують сайтами зв'язування ряду факторів транскрипції, регулюючи експресію гена інсуліну. Транскрипційні фактори активують енхансери гену препроінсуліну [22].

Регуляція секреції інсуліну. При низьких концентраціях глюкози більша частина β -клітин знаходиться в стані спокою. Підвищення концентрації глюкози приводить до того, що реагує все більше число клітин, а кількість гранул інсуліну всередині кожної клітини підвищується. Це говорить про те, що клітинні відповіді скоординовані, можливо, шляхом міжклітинних комунікацій. Найбільш важливим фактором в стимуляції глюкозою являється не збільшення кількості β -клітин (при стимуляції глюкозою показано збільшення приблизно в чотири рази), а можливо, збільшення кількості гранул в клітині (яке збільшується в 9-10 разів). Основним медіатором секреції інсуліну є Ca^{2+} [23].

Активація секреції інсуліну:

1. Після проникнення глюкози в β -клітини (через ГлюТ-1 і ГлюТ-2) вона фосфорилується гексокіназою IV.
2. Далі глюкоза аеробно окиснюється, при цьому швидкість окиснення глюкози пропорційно залежить від її кількості.
3. В результаті виробляється АТФ, кількість якого також прямо залежить від концентрації глюкози в крові.
4. Накопичення АТФ стимулює закриття іонних K^+ -каналів, що приводить до деполяризації мембрани.
5. Деполяризація мембрани спричиняє відкриття потенціал-залежних Ca^{2+} -каналів і притоку іонів Ca^{2+} в клітину.
6. Іони Ca^{2+} , які надходять, активують фосфоліпазу С і запускають кальцій-фосфоліпідний механізм проведення сигналу з утворенням ДАГ і інозитол-трифосфату (IP_3).
7. Поява IP_3 в цитозолі відкриває Ca^{2+} -канали в ендоплазматичному ретикулумі, що прискорює накопичення іонів Ca^{2+} в цитозолі.

8. Різке збільшення концентрації в клітині іонів Ca^{2+} приводить до переміщення секреторних гранул до плазматичної мембрани, їх з'єднання з нею і екзоцитозу кристалів зрілого інсуліну назовні.
9. Далі відбувається розпад кристалів, відділення іонів Zn^{2+} і вихід молекул активного інсуліну в кровотік.



Рис. 2.2.3 Схема внутрішньоклітинної регуляції секреції інсуліну за участю глюкози [23]

Описаний вище механізм може корегуватися в ту чи іншу сторону під дією ряду інших факторів, таких як амінокислоти, жирні кислоти, гормони та нервова регуляція. Із амінокислот на секрецію гормону найбільше впливає лізин та аргінін. Але самі по собі вони майже не стимулюють секрецію, їх ефект залежить від наявності гіперглікемії, тобто амінокислоти тільки потенціюють дію глюкози.

Вільні жирні кислоти також являються факторами, які стимулюють секреції. Інсуліну, але також тільки в присутності глюкози. Логічною являється позитивна чутливість секреції інсуліну до дії гормонів шлунково-кишкового тракту – інкретинів (ентероглюкагону і глюкозозалежного інсулінотропного поліпептиду), холецистокініну, секретину, гастрину, шлункового інгібуючого поліпептиду [23].

Клінічно важливим і в якійсь мірі небезпечним є посилення секреції інсуліну при тривалому впливі соматотропного гормону, АКТГ і глюкокортикоїдів, естрогенів, прогестинів. При цьому зростає ризик виснаження β -клітин, зменшення синтезу інсуліну і виникнення інсулінозалежного цукрового діабету. Таке може спостерігатися при використанні зазначених гормонів в терапії або при патологіях, пов'язаних з їх гіперфункцією. Нервова регуляція β -клітин підшлункової залози включає адренергетичну і холшнергетичну регуляцію. Будь-які стреси (емоційні або фізичні навантаження, гіпоксія, переохолодження, травми, опіки) підвищують активність симпатичної нервової системи і пригнічують секрецію інсуліну за рахунок активації α_2 -адренорецепторів. З іншого боку, стимуляція β_2 -адренорецепторів призводить до посилення секреції [24].

2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

Активність препаратів інсуліну досліджують біологічними методами в ОД. За 1 ОД приймають таку кількість інсуліну, яке знижує концентрацію глюкози в крові на 45 мг/дл. 1 ОД інсуліну утилізує близько 5,0 г глюкози крові. 1 мг міжнародного стандарту інсуліну містить 24 ОД. Перші препарати містили 1 ОД в мл, сучасні комерційні препарати інсуліну випускають в вигляді двох концентрацій:

- U-40 – містять 40 ОД/мл. Така концентрація використовується при введенні інсуліну за допомогою звичайного шприца;
- U-100 – містять 100 ОД/мл. Дана концентрація використовується при введенні інсуліну за допомогою шприца-ручки [25].

Допоміжними речовинами можуть бути: цинк хлорид, гліцерин, метакрезол, фенол, натрій гідроксид або хлористоводнева кислота, протамін сульфат, вода

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		32

для ін'єкцій. Якість інсуліну залежить від його виду і від ступеня очищення, виражається в ppm (particles per million) – кількість частинок домішок на 1 млн частинок інсуліну. Згідно з вимогами Європейської фармакопеї, ppm для монокомпонентних інсулінів має бути менше 10. Крім того, рН препаратів інсуліну повинна бути нейтральною.

Після процесу біосинтезу та очищення біотехнологічного препарату одержують високоочищений людський інсулін з рівнем чистоти не менше 98% та активністю більше 27,5 ОД/мг.

Вміст механічних домішок допускається, якщо часточки мають розмір більше 10 мкм, то їх має бути не більше 7000 в 1 мг; часток з розміром ≥ 25 мкм має бути не більше 800 в 1 мг. Концентрація ендотоксинів має бути ≥ 90 МО в 1мг препарату, супровідних білків менше 7% [26].

2.4. Методи очистки цільового продукту

Головною антигенною домішкою в препаратах інсуліну є проінсулін, саме через нього бувають виражені алергічні реакції при лікуванні хворих на цукровий діабет. За сучасними вимогами вміст проінсуліну в препараті не повинно перевищувати 10 частин на мільйон (10 п. п. м.), тобто не має становити більше 0,001%. Такі ж самі високі вимоги застосовуються до вмісту бактеріальних пептидів в інсуліні людини, отриманих біотехнологічними методами.

Відомий спосіб очищення інсуліну хроматографією на аніоніті дауекс 1Х2 і QAE-сефадекса А-25. Недолік цього способу – низький вихід очищеного інсуліну (40-60%), а також використання при хроматографії складних водно-органічних сумішей, що містять 60% горючих і отруйних компонентів, таких як метанол або етанол.

В іншому способі очищення інсуліну катіонобмінною хроматографією на слабо-кислому катіоні (амберліт CG 50) передують п'ять додаткових стадій:

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		33

цитратна кристалізація, хроматографія на сефадексі G-50, осаджування хлоридом натрію, ізоелектричне осадження і друга цитратна кристалізація, а виділення очищеного інсуліну після катіонобмінної хроматографії включає три стадії: осаджування хлоридом натрію, ізоелектричне осадження і цитратна кристалізація. Недоліком цього способу, крім складності і трудоемності, є невисокий вихід інсуліну (53%), а також застосування при катіонобмінній хроматографії складного буфера, що включає 0,13М фосфат натрію, 7М сечовину і 1% н-бутанол [27].

Відомий спосіб очищення інсуліну шляхом сорбції інсуліновмісної сировини на мікропористому сульфокатіоніті з величиною частинок 20-60 мкм, змішаному з інертним силікатним наповнювачем (величина частинок розміром 40-120 мкм) в рівному об'ємному співвідношенні, з подальшим промиванням суміші мікродисперсії і наповнювача 0,20-0,30М оцтовоамонійним буфером при рН 5,2-6,4 і десорбцією інсуліну 0,02-0,3М буферним розчином при рН 6,4-7,6. Процес хроматографії в прототипі можливий через малий розмір зерен катіоніту лише в присутності наповнювача. Наявність наповнювача виключає можливість регенерації смоли в режимі псевдозрідження, оскільки смола і наповнювач будуть розшаровуватися. Таким чином, застосування наповнювача в прототипі є вимушеним заходом, оскільки в його відсутності хроматографія буде протікати з дуже малими швидкостями. До недоліків відомого способу відносяться: необхідність застосування наповнювача при хроматографії, невисокий вихід інсуліну після очищення (64-70%), висока антигенність інсуліну (зміст проінсуліну 0,5%) [28].

Найбільш близьким до пропонованого є спосіб очищення інсуліну за допомогою гель-проникаючої хроматографії на зшитих декстринових гелях в 0,5М оцтової кислоти. Після очищення за цим способом інсуліну ВРХ з вихідним вмістом інсуліну та проінсуліну відповідно 92,5 і 4,21% отримують інсулін, який

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		34

ще містить 0,44% проінсуліну (замість необхідного вмісту не більше 0,001%). При аналогічній гель-проникаючої хроматографії свинячого інсуліну (вміст у вихідному матеріалі інсуліну і проінсуліну 90,7 і 2,42% відповідно) отримують інсулін, також лише частково очищений від проінсуліну: в цільовому продукті його кількість становить 0,57%, тобто перевищує необхідну в 570 разів. Таким чином, відомий спосіб не дозволяє отримувати інсулін необхідного ступеня чистоти щодо основної антигенної домішки - проінсуліну. Для поліпшення якості і забезпечення високого виходу інсуліну по заявленому способу свинячий інсулін, інсулін великої рогатої худоби або біосинтетичний, наприклад, генно-інженерний інсулін людини піддають гель-проникаючої хроматографії в водній оцтовій кислоті на гідрофільному гелі ("Гефіл-1"). Вихід цільового продукту становить 75-85% з вмістом монофракції інсуліну 98,0-98,5%, при цьому вміст проінсуліну становить менше 2 п.п.м., а вміст бактеріальних пептидів – менше 1 п.п.м. (тобто менше 0,0001%), кількість дезамідоінсуліну і неідентифікованих домішок у всіх випадках не перевищують 1% [28].

2.5. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Дія інсуліну починається з його зв'язування зі специфічним глікопротеїновим рецептором на поверхні клітини-мішені. Різні ефекти цього гормону можуть проявлятися або через декілька секунд або хвилин (транспорт, фосфорилування білків, активація та інгібування ферментів, синтез РНК), або через декілька годин (синтез білка, ДНК та клітинний ріст).

Інсуліновий рецептор детально вивчений за допомогою біохімічних методів і технології рекомбінантних ДНК. Він представляє собою гетеродимер, який складається з двох субодиниць (α і β) в конфігурації $\alpha_2\beta_2$, зв'язаних між собою дисульфідними містками (рис 2.5.1.).

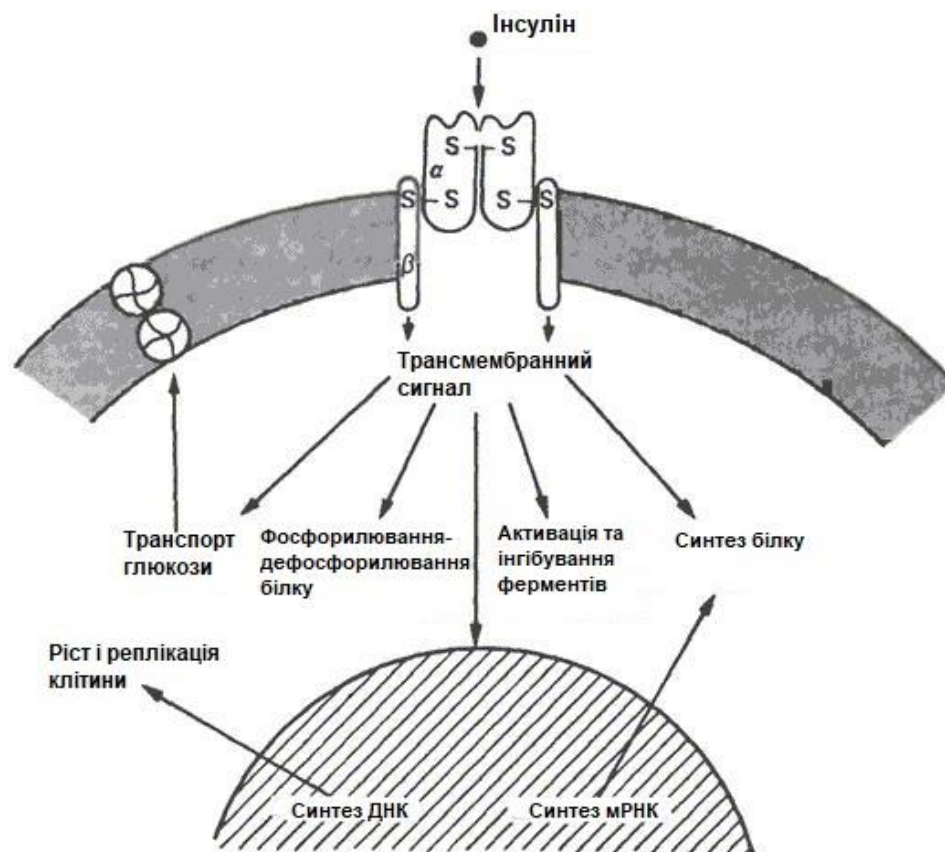


Рис 2.5.1. Зв'язок між рецептором інсуліну та його дією [21]

Обидві субодиниці містять багато глікозидних залишків. Видалення сілової кислоти і галактози знижує здатність зв'язувати інсулін, а також активність цього гормону. Кожна із глікопротеїнових субодиниць володіє особливою структурою та певною функцією. α -субодиниця, яка має молекулярну масу 135 000, повністю розташована поза клітиною і зв'язування інсуліну відбувається за допомогою домену, багатого на цистин. β -субодиниця, молекулярною масою 95 000, це трансмембранний білок, який виконує другу важливу функцію рецептору, тобто перетворення сигналу [29].

Рецептор інсуліну постійно синтезується та розпадається, його період напівіснування становить 7-12 год. Рецептор синтезується у вигляді одноланцюгового пептиду в шорсткому ендоплазматичному ретикулумі і швидко гліколізується в апараті Гольджі. Попередник людського рецептору інсуліну

складається із 1382 амінокислот, при розщепленні він утворює зрілі α і β -субодиниці. У людини ген інсулінового рецептору локалізований в 19 хромосомі.

При зв'язуванні інсуліну з рецептором відбувається наступне:

1. Змінюється конформація рецептору;
2. Рецептори зв'язуються один з одним, утворюючи мікроагрегати, наліпки та плями;
3. Рецептор піддається інтерналізації;
4. Відбувається утворення сигналу.

Вплив на метаболізм ліпідів. Інсулін являється потужним інгібітором ліполізу в печінці і жировій тканині, проявляючи непряму анаболітичну дію. Частково це може бути наслідком здатності інсуліну понижати вміст cAMP (рівень якого в тканинах підвищується під дією ліполітичних гормонів глюкагона та адреналіну), а також здатності інсуліну інгібувати активність гормон-чутливої ліпази. В основі такого інгібування лежить активація фосфатази, яка дефосфорилує і тим самим інактивує ліпазу. В результаті інсулін знижує вміст жирних кислот в крові [30].

Вплив на метаболізм білків. Інсулін, як правило, надає анаболітичну дію на білковий обмін, оскільки він стимулює синтез білків і зменшує їх розпад. Інсулін стимулює поглинання м'язом нейтральних амінокислот типу А – ефект, який не пов'язаний з поглинанням глюкози або з наступним включенням амінокислот в білки. Вплив інсуліну на синтез білків в скелетних та серцевих м'язах проявляється на рівні трансляції мРНК.

Вплив на трансляцію мРНК. Відомо, що інсулін впливає на кількість і активність як мінімум 50 білків в різних тканинах, причому багато з цих ефектів зводяться до ковалентної модифікації. Уявлення про роль інсуліну в трансляції мРНК ґрунтується головним чином на даних про рибосомний S6-білок – компонент рибосомної субодиниці 40S. Такий механізм міг би забезпечувати

загальний вплив інсуліну на синтез білків в печінці, скелетних та серцевих м'язах [31].

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 2

Інсулін має кристалічну структуру, зберігається в згрупованих “гранулах” та складається з двох поліпептидних ланцюгів. Інсулін отримують трьома способами: тваринного походження, напівсинтетичним та генно-інженерним. Так як тваринний інсулін має ряд домішок, що викликають алергію, інтерес до рекомбінантного інсуліну дедалі більшає. Механізми виробництва інсуліну можуть корегуватися в ту чи іншу сторону під дією ряду факторів, таких як амінокислоти, жирні кислоти, гормони та нервова регуляція.

Так як головною домішкою в препаратах інсуліну є проінсулін, існують поширені методи очистки цільового продукту, такі як: очищення інсуліну хроматографією на аніоніті дауекс 1X2 і QAE-сефадекса А-25, катіонобмінна хроматографія на слабо-кислому катіоні, очищення інсуліну шляхом сорбції інсуліновмісної сировини на мікропористому сульфокатіоніті з величиною частинок 20-60 мкм.

Інсулін, як правило, надає анаболітичну дію на білковий обмін, оскільки він стимулює синтез білків і зменшує їх розпад. Активність препаратів інсуліну виражають біологічними методами в ОД, існують U-40 і U-100 концентрації.

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ док-м.	Підпис	Дата		38

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту

Рекомбінантна плазмідна ДНК pHINS05 містить ген, що кодує гібридний білок, що складається з N-кінцевого фрагменту гамма-інтерферону людини, пептидного лінкеру His₄GlySerArg і проінсуліну людини. За допомогою рекомбінантної плазмідної ДНК pHINS05 трансформують клітини *E. coli* і отримують штам *E. coli* JM109/pHINS05 – продуцент гібридного білку з проінсуліном людини.

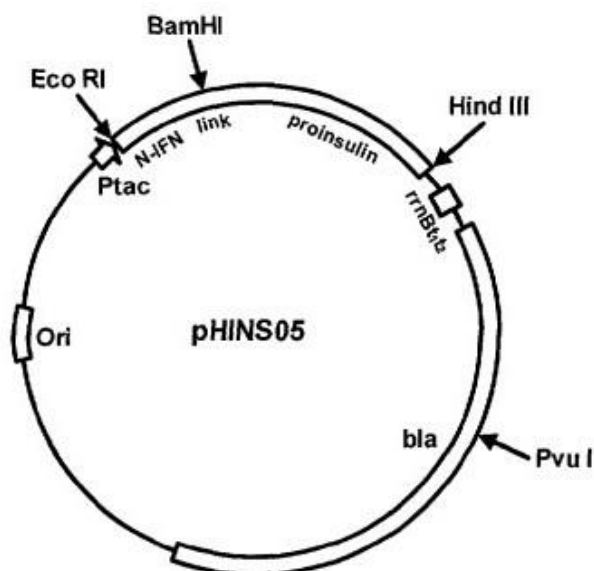


Рис. 3.1.1. Схема рекомбінантної плазміди pHINS05 [32]

На рисунку 3.1.1. вказані сайти ендонуклеаз рестрикції. Ori – ділянка ініціації реплікації, Ptac – промотор транскрипції, rrnBt₁₂ – термінатор транскрипції рибосомного оперону *E. coli*, bla – ген β-лактамази. В гені гібридного білку вказані кодуючі послідовності: N-IFN-N-кінцевий фрагмент гамма-інтерферону людини, link – пептидний лінкер His₄GlySerArg, proinsulin – проінсулін людини [32].

					ДП 6113. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ		
Розробив	Лемішко Ю.К.						
Консульт.							
Керівник	Карпенко Ю.В.						
Затверд.							
					Стадія	Аркуш	Аркушів
						39	
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

Рекомбінантна плазмідна ДНК рHINS05 характеризується наступними ознаками:

1. Молекулярна маса – 2,75 МДа;
2. Складається з: BamHI-EcoRI - фрагмента плазміді рKK223-3, що містить промотор транскрипції tac, HindIII-EheI - фрагмента плазміді рKK223-3, який містить ген β -лактамази (bla), ділянки ініціації реплікації (ori), термінатор транскрипції рибосомного оперона *E. coli*, EcoRI-HindIII – це фрагмент, який містить ген з послідовністю нуклеотидів, яка представлена на рис. 3.1.2, кодує N-кінцевий фрагмент гамма-інтерферону людини, пептидний лінкер His₄GlySerArg і амінокислотну послідовність проінсуліну людини;
3. Містить: tac-промотор транскрипції, ген, що кодує гібридний білок, в якому N-кінцева послідовність гамма-інтерферону з'єднана через пептидний лінкер His₄GlySerArg з амінокислотою послідовністю проінсуліну людини; в якості генетичного маркера ген β -лактамази (bla), який визначає стійкість трансформованих плазмідною рHINS05 клітин бактерії до ампіциліну.

Нуклеотидна послідовність гену гібридного білку з проінсуліном людини плазміді рHINS05 і кодуюча ним амінокислотна послідовність представлена на рис. 3.1.2. Ініціюючий і термінуючий кодони виділені жирним шрифтом.

ATGCAGGACCCATATGTAAAAGAAGCAGAAAACCTTAAGAAATATTTTAATGCAGGTCAT
 MetGlnAspProTyrValLysGluAlaGluAsnLeuLysLysTyrPheAsnAlaGlyHis

 TCAGATGTAGCGGATAATGGAACCTCTTTCTTAGGCATTTTGAAGAATTGGAAAGAGGAG
 SerAspValAlaAspAsnGlyThrLeuPheLeuGlyIleLeuLysAsnTrpLysGluGlu

 AGTGATCATCATCACCATGGATCCCGTTTTGTAAACCAACACCTGTGCGGTTCTCACCTG
 SerAspHisHisHisHisGlySerArgPheValAsnGlnHisLeuCysGlySerHisLeu

 GTTGAAGCTCTGTACCTGGTTTGCGGTGAACGTGGTTTCTTCTACACCCCGAAGACCCGT
 ValGluAlaLeuTyrLeuValCysGlyGluArgGlyPhePheTyrThrProLysThrArg

 CGTGAAGCTGAAGACCTGCAGGTTGGTCAGGTTGAACTGGGTGGTGGTCCGGGTGCTGGT
 ArgGluAlaGluAspLeuGlnValGlyGlnValGluLeuGlyGlyGlyProGlyAlaGly

 AGCCTGCAACCGCTGGCTCTGGAAGGTTCTCTGCAGAAGCGTGGTATCGTTGAACAGTGC
 SerLeuGlnProLeuAlaLeuGluGlySerLeuGlnLysArgGlyIleValGluGlnCys

 TGCACCTCTATCTGCTCTGTACCAGCTGGAAACTACTGCAACTAG
 CysThrSerIleCysSerLeuTyrGlnLeuGluAsnTyrCysAsn---

Рис. 3.1.2. Нуклеотидна послідовність гену гібридного білку з проінсуліном людини плазміді pHINS05 [32]

Перевагою запропонованої плазмідної конструкції є те, що вона забезпечує ефективний біосинтез гібридного поліпептиду, що містить більш високу частку проінсуліну людини за рахунок зменшення розміру лідерної послідовності [32].

3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту

3.2.1. Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів

Дуже важливим елементом будь-якого селекційного процесу є добір. За його допомогою відбувається виведення нових форм організмів із властивостями, які різко відрізняються від властивостей вихідного батьківського типу. Весь метаболізм таких культур переважно підпорядкований синтезу однієї конкретної речовини. Головною задачею селекції являється отримання організмів з новими властивостями, які зберігаються і передаються від покоління до покоління. [33]

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докum.	Підпис	Дата		41

Штучний добір застосовується людиною, яку цікавлять окремі ознаки мікроорганізму і може призводити до дезорганізації генетичних та морфогенетичних кореляційних систем організмів. В свою чергу природний добір надає перевагу лиш тим властивостям організмів, які забезпечують їх пристосованість і сприяють закріпленню цілих комплексів адаптивних ознак. Взагалі природний і штучний добір відносно мікроорганізмів застосовують, коли відбирають штами, які надалі надалі будуть розглядатися під дією інших методів. Додаткова обробка не вимагається до більшої частини культур, для яких використовується даний метод, так як їх біосинтетична здатність загальновідома, а процес відбору будується лише на виділенні найпродуктивніших колоній і біосинтетична здатність обмежується лише властивостями середовища [34].

Щоб отримати продуцентів інсуліну не використовуються природний і штучний добір.

3.2.2. Використання індукованого мутагенезу

Мутагенез – процес виникнення мутацій під дією мутагенних факторів (частіше всього навколишнього середовища – фізичних, хімічних та рідше – біологічних). До фізичних мутагенів відносять іонізуюче випромінювання, а також електромагнітні поля. До хімічних: пестициди, нітроти, важкі метали, радіоактивні речовини [35].

Індукований мутагенез і відбір продуктивних мутантів на сьогоднішній час залишається важливим методом підвищення активності промислових штамів мікроорганізмів, наприклад в селекції продуцентів антибіотиків. При цьому оброблену культуру мутагенів розсіюють на щільні живильні середовища, щоб отримати окремі колонії, а потім досліджують кожен клон на продуктивність. Після виділення найпродуктивнішого варіанту, процедуру мутагенезу і відбору повторюють, тобто проводять ступінчастий відбір [36].

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
						42
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

Для отримання продуцентів інсуліну не використовується індукований мутагенез.

3.2.3. Використання гібридизації для створення промислових продуцентів біологічно-активних речовин

Найбільш простий спосіб створення організмів з бажаним комплексом генетично обумовлених ознак – це схрещування організмів, що належать до протилежних статевих типів. Однак до недавнього часу гібридизація як метод селекції в мікробіології та біотехнології застосовувався надзвичайно рідко, тому що схрещування не застосовується в світі мікроорганізмів і зустрічається в природі як виняток, а не як закономірний спосіб розмноження. Даний метод у мікроорганізмів здійснюється за допомогою трансформації, трансдукції та кон'югації [37].

Трансформація бактерій – це процес переносу спадкових властивостей від однієї бактерії (донор) до інших (реципієнтів) за рахунок допомоги екстрагованої ДНК, при цьому не відбувається прямий контакт обох клітин, а також участь не бере бактеріофаг. Спостерігається лише у небагатьох бактерій.

Трансдукція – процес переносу ДНК за допомогою бактеріофагу. Даний процес використовується для картування геному та конструювання штамів. При цьому вірулентні фаги можуть знищувати популяцію бактерій, тому процес трансдукції з їх допомогою не має великого значення в проведенні досліджень.

Кон'югація – процес передачі спадкової інформації за допомогою плазмід, при цьому передача генетичного матеріалу здійснюється через цитоплазматичні містки. В більшості випадків плазміди мають гени, які детермінують стійкість клітини до різних антибіотиків [38].

Для отримання продуцентів інсуліну не використовується метод гібридизації.

3.2.4. Регуляція метаболізму у мікробній клітині

Під час регуляції мікробного метаболізму беруть участь механізми, що змінюють ферментативний склад клітини. Генетична інформація, яка є необхідною для синтезу гормонів завжди присутня в клітині, але її фенотипова проява залежить від умов навколишнього середовища і відповідно даний фермент може синтезуватися тільки тоді, коли присутній його субстрат. Бактеріальні клітини зупиняють біосинтез, коли кінцевий продукт шляху не потрібний або його легко отримати шляхом поглинання з навколишнього середовища [39].

Індукція синтезу ферменту відбувається під дією некаталітичних алостеричних білків, які є продуктами певних регуляторних генів; вони контролюють синтез ферментів негативно, тобто зв'язуються з бактеріальною хромосомою в будь-якому місці поблизу структурних генів і блокують транскрипцію.

Якщо додати в поживне середовище сполуку, яка є кінцевим продуктом біосинтезу, це призведе до гальмування або швидкої зупинки синтезу ферментів цього шляху. Регуляторні процеси в клітині відбуваються на різних рівнях і починаються на рівні геному. Коли синтез ферментів пригнічується кінцевим продуктом, то вони можуть бути депресовані. Вони починають синтезуватися швидше, якщо внутрішньоклітинна концентрація кінцевого продукту падає до низького рівня [40].

Для отримання продуцентів інсуліну не використовують регуляцію метаболізму.

3.2.5. Використання методів генної та клітинної інженерії

Конструювання штамів *E. coli* з використанням методів генетичної інженерії привело сьогодні до виникнення багатьох біотехнологічних процесів. Головним

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
						44
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

чином це процеси отримання білків людини, сільськогосподарських тварин бо їх вірусів. Число таких білків наближається до ста, хоча кількість препаратів, які дозволені використовувати, поки що невелика – це інсулін, лейкоцитарний інтерферон, деякі вакцини і діопностикуми [41].

Дана плазмідна *E. coli*, яка створена методом генної інженерії має ряд переваг, а саме: невеликий розмір, має специфічні сайти рестрикції, що здійснюють вставку екзагенної ДНК та наявні один або декілька селективних маркерів для ідентифікації клітин, що несуть рекомбінантну ДНК.

Плазмиду обробляють рестриктазою, яка розщеплює кільце плазмиди лише в одному сайті одного з генів стійкості. Таким чином утворюється лінійна молекула з липкими кінцями. Такі молекули змішують з попередньо обробленою рестриктазою донорної ДНК (яка містить необхідний ген). Така ДНК теж має липкі кінці. Оскільки липкі кінці цих двох ДНК комплементарні, вони спарюються з утворенням гібридних молекул, тобто утворюється рекомбінантна кільцева плазмідна, яку вводять *E. coli*, щоб надалі потомство даної бактерії мало чужорідний ген. Щоб підвищити проникність клітини *E. coli* для кільцевої плазмиди, клітину обробляють холодним розчином кальцію хлорид, потім нагрівають на витримують при температурі 40°C 1,5 хвилини. За допомогою цього місцево руйнується клітинна стінка [42].

Перевагою даної плазмідної конструкції є те, що вона забезпечує ефективний біосинтез гібридного поліпептиду, який містить більш високу частку проінсуліну людини за рахунок зменшення розміру лідерної послідовності.

3.3. Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

Вихідною плазмідною для конструювання нового гену, що кодує гібридний білок, що містить проінсулін людини, послужила плазмідна рNGIF01. Ця плазмідна була сконструйована на основі векторної ДНК рKK223-3, у якій був вилучений

фрагмент BamHI-Ehe I розміром приблизно 830 н.п., за допомогою добудови "липких" кінців після часткового гідролізу по BamHI і повного гідролізу по Ehe I і подальшого лігірування отриманих "тупих"-кінців. Отримана таким чином плазмідна ДНК рKK223-3-del розміром приблизно 3750 н.п. була використана в якості вектору для клонування фрагмента ДНК, що кодує N-кінцеву послідовність гамма-інтерферону людини, по сайтам EcoRI і BamHI. Фрагмент ДНК, що кодує N-кінцеву послідовність гамма-інтерферону з додатковими 4His, був синтезований за допомогою полімеразної ланцюгової реакції на матриці плазмідної ДНК рTTgKm2 в присутності специфічних праймерів. Перед клонуванням продукт ампліфікації був оброблений рестриктазами EcoRI і BamHI для генерації "липких" кінців.

Отримана плазмідна ДНК рNGIF01 містить між сайтами EcoRI і BamHI послідовність, що кодує N-кінцевий фрагмент гамма-інтерферону людини з додатковими 4His. Далі плазмідна рNGIF01 була використана для конструювання плазмідної ДНК, що кодує гібридний білок, в якому N-кінцева послідовність гамма-інтерферону з додатковими 4His з'єднана з послідовністю проінсуліну людини. Для цього нуклеотидна послідовність, що кодує проінсулін людини, під дією сайтів рестрикції BamHI і HindIII, була отримана з плазмідної ДНК рPINS07 і клонована в вектор, отриманий гідролізом плазмідної ДНК рNGIF01 тими ж рестриктазами. Лігрованою сумішшю трансформували компетентні клітини штаму E.coli JM109. В результаті отримали рекомбінантну плазмідну ДНК рHINS05, будову якої підтверджували рестрикційними аналізом. Структура гена, що кодує гібридний білок, була підтверджена секвенуванням [43].

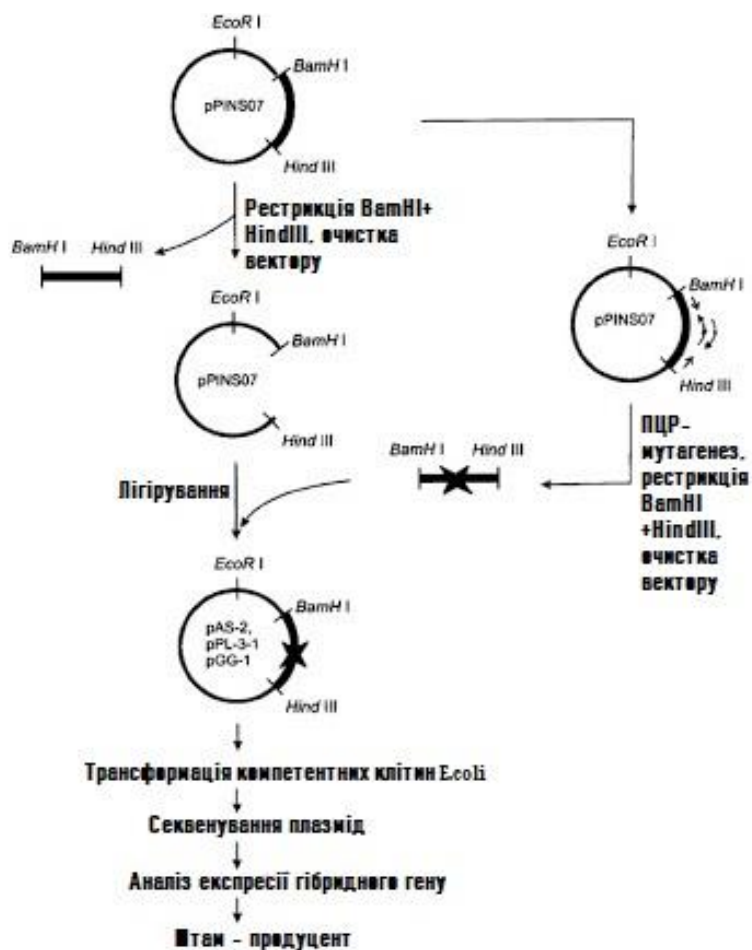


Рис 3.3.1. Схема отримання рекомбінантних плазмід [32]

Схему отримання продуцента інсуліну *E.coli* штаму JM109/pHINS05 зображено на рис. 3.3.2.



Рис 3.3.2. Схема отримання продуцента інсуліну *E.coli* JM109/pHINS05

Для конструювання рекомбінантної плазмідної ДНК pHINS05 застосовують наступні дії: до розчину 5 мкг плазмідної ДНК pNGlF01 в 20 мкл буфера, що містить 33 мМ Тріс-ацетату, рН=7,9, 66 мМ К-ацетата, 10 мМ Mg-ацетату і 0,1 мг/мл БСА, додають 10 од рестриктази BamHI і 7 од рестриктази HindIII, суміш інкубують 2,0 години при 37°C. Потім суміш прогрівають 10 хв при 70°C для інактивації ферментів і плазмідну ДНК осаджують етиловим спиртом і розчиняють в 10 мкл води.

До розчину 15 мкг плазмідної ДНК pPINS07 в 30 мкл буфера, що містить 33 мМ Тріс-ацетату, рН=7,9, 66 мМ К-ацетата, 10 мМ Mg-ацетату і 0,1 мг/мл БСА, додають 10 од рестриктази BamHI і 7 од рестриктази HindIII, суміш інкубують

2,0 годину при 37°C. Потім суміш розділяють електрофоретично в 0,8% агарозному гелі. Фрагмент ДНК розміром 270 н.п., що кодує проінсулін людини, виділяють з агарози, екстрагують фенолом, сумішшю фенолу з хлороформом (1:1), осаджують етиловим спиртом і розчиняють в воді.

0,5 мкг гідролізованої плазмідної ДНК pNGlF01 лігують з 5 мкг фрагменту BamHI-HindIII, що містить послідовність проінсуліну людини 30 мкл буфера для лігування і 5 од ДНК лігази фага T4 протягом 16 год при 8°C. 10 мкл лігрованої суміші трансформують компетентні клітини штаму *E.coli* JM109 і висівають на LB-агар, що містить 100 мкг/мл ампіциліну. З колоній виділяють плазмідну ДНК і проводять рестрикційний аналіз. Остаточну будову плазмід рHINS05 підтверджують визначенням повної нуклеотидної послідовності між сайтами рестриктаз EcoRI і HindIII [32].

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3

Рекомбінантна плазмідна ДНК рHINS05, яка використовується у виробництві, містить ген, що кодує гібридний білок, що складається з N-кінцевого фрагменту гамма-інтерферону людини, пептидного лінкеру His₄GlySerArg і проінсуліну людини. Основною перевагою запропонованої плазмідної конструкції є те, що вона забезпечує ефективний біосинтез гібридного поліпептиду, що містить більш високу частку проінсуліну людини за рахунок зменшення розміру лідерної послідовності.

Використовують метод генної та клітинної інженерії і тому плазмідна *E. coli* має ряд переваг, а саме: невеликий розмір, має специфічні сайти рестрикції, що здійснюють вставку екзагенної ДНК. Також наведена схема отримання продуцента інсуліну *E.coli* штаму JM109/pHINS05.

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		49

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва

Назва продукції: інсулін рекомбінантний в картриджах на прикладі препарату “Протафан НМ”.

Фармакотерапевтична група. Антидіабетичні препарати. Інсулін та аналоги середньої тривалості дії. Код АТС A10A C01.

Діюча речовина: інсулін людський (рДНК); 1мл суспензії для ін’єкцій містить 100 МО (3,5 мг) інсуліну людського біосинтетичного (кристали ізофан-інсуліну), виробленого за технологією рДНК.

Допоміжні речовини: цинку хлорид, гліцерин, метакрезол, фенол, натрію гідрофосфат дигідрат, натрію гідроксид, кислота хлористоводнева розведена, протаміну сульфат, вода для ін’єкцій.

Опис. Суспензія білого кольору, яка при стоянні розшаровується, утворюючи білий осад і безбарвну або майже безбарвну надосадову рідину. При перемішуванні осад повинен суспендуватися.

№ реєстраційного посвідчення: UA/2700/01/01. Відповідно до вимог GMP ЄС і ГОСТ Р 52249-2004.

Фармакодинаміка. Цукрознижувальний ефект інсуліну полягає в сприянні поглинанню глюкози тканинами після зв’язування інсуліну з рецепторами м’язових і жирових клітин, а також в одночасному пригніченні виділення глюкози з печінки.

Протафан® є інсуліном пролонгованої дії. У середньому профіль дії після підшкірної ін’єкції такий:

початок дії - протягом 1,5 години; максимальний ефект - від 4 до 12 годин;

					ДП 6113. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив	Лемішко Ю.К.						50	
Консульт.								
Керівник	Карпенко Ю.В.					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Затверд.								

тривалість дії - приблизно 24 години.

Фармакокінетика. Період напів-виведення інсуліну з крові становить кілька хвилин, тому профіль дії препарату інсуліну обумовлений виключно характеристиками його абсорбції. Цей процес залежить від ряду факторів (наприклад від дози інсуліну, способу і місця ін'єкції, товщини підшкірної клітковини, типу діабету), що зумовлює значну варіабельність ефекту препарату інсуліну як у одного, так і в різних хворих.

Клінічні характеристики

Показання. Лікування цукрового діабету.

Протипоказання. Гіпоглікемія. Підвищена чутливість до людського інсуліну або до будь-якого інгредієнта препарату.

Форма випуску. Суспензія для підшкірного введення 100 МО/мл. По 3 мл препарату в картриджі зі скла 1 гідролітичного класу, закупорені каучуковими пробками. За 5 картриджів у блістерній упаковці з інструкцією по застосуванню в картонній упаковці. По 5 мл або по 10 мл у флаконі. По 1 флакону у пачці.

Термін придатності. 30 місяців.

Умови зберігання. Зберігати в холодильнику при температурі від 2°C до 8°C (не надто близько до морозильної камери). Не заморозувати. Зберігати картридж в картонній пачці для захисту від світла. *Для розкритих картриджів:* зберігати при температурі не вище 30°C протягом 6 тижнів. Не рекомендується зберігати в холодильнику. Препарат слід захищати від впливу тепла і сонячного світла. Зберігати в недоступному для дітей місці [44].

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		51

4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

Таблиця 4.1. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
1. Основна сировина:			
1.1. Ампіцилінова натрієва сіль	ГОСТ 939881	—	Компонент ПС
1.2. Вода очищена	ДСТУ 7525:2014	Згідно вимогам	Компонент ПС
1.3 Вода для ін'єкцій	ДСТУ 7525:2014	Згідно вимогам	Входить до кінцевого продукту
1.4 Вода технічна	ДСТУ 7525:2014	Згідно вимогам	Для підігріву ферментера
1.5. Гідролізат казеїну	ГОСТ 935725	Чистота, розмір не більше 0,25 мм	Компонент ПС
1.6. Гліцерин	ГОСТ 6259-75	Стерильність	Рефолдинг
1.7. Гліцин	ГОСТ 5860-75	Масова доля не менше 99%	Рефолдинг
1.8. Глюкоза	ГОСТ 6038-79	Згідно вимогам	Компонент ПС
1.9. Двозаміщений фосфат калію	ГОСТ 2493-75	Масова доля не менше 99%	Компонент ПС

1.10. Екстракт пекарських дріжджів	ГОСТ 10444.1	Мікробіологічна чистота	Компонент ПС
1.11. ППГТ	Кат. № 209670	—	Індуктор
1.12. Карбоксипептидаза Б	Кат. № 470524	—	Для ферментативного гідролізу
1.13. Натрій гідроксид	ГОСТ 4328-77	Масова доля не менше 99%	Для регулювання рН
1.14. Однозаміщений фосфат калію	ГОСТ 4198-75	Масова доля не менше 99,5%	Компонент ПС
1.15. Пептон	ГОСТ 13805-76	Масова частка істинного пептона не менше 70%	Компонент ПС
1.16. Повітря очищене	ГОСТ Р ІСО 8573-1-2016	Кількість КУО, не більше ніж 10-6 кл/м3	Для аерації
1.17. Сечовина	ГОСТ 2081-10	Масова доля азоту не менше 46,3	Для руйнування клітин
1.18 Соляна кислота	ГОСТ 3118-77	Масова доля не менше 35-38%	Для регулювання рН
1.19. Сульфат магнію	ГОСТ 4523-77	Масова доля не менше 99,5%	Компонент ПС

1.20. Трипсин	ГОСТ 935855	—	Для ферментативного гідролізу
1.21. Хлорид натрію	ГОСТ 4233-77	Масова доля не менше 99,9%	Компонент ПС
2. Допоміжна сировина:			
2.1. Амоній ацетат	ГОСТ 3117-78	Масова доля не менше 98,5%	Для приготування буферу
2.2. Буфер	ГОСТ 4919-16	Відповідно до вимог	Іонообмінні процеси
2.3. Вода питна	ДСТУ 7525:2014	Смак, запах, вміст мікробних частин, рН, жорсткість	Для ополіскування
2.4. Етиловий спирт	ГОСТ 18300-87	Об'ємна доля не менше 96,2%	Для дезінфекції
2.5. Лимонна кислота	ГОСТ 908-2004	Масова доля не менше 99,5%	Для приготування буферу
2.6. Миючий засіб "Біолот"	ТУ 18 РСФСР 718-77	Згідно вимог	Для миття обладнання, поверхонь, прання одягу
2.7. Пропанол	«Merck», кат. N 109634	—	Для приготування буферу
2.8. Пропінол Б-400	ТУ 6-14-300-80	—	Піногасник

Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата

ДП 6113. 00.000 ПЗ

Арк.

54

2.9. Хлорамін Б	ГОСТ 939214	Згідно вимог	Для дезінфекції
2.10. Хлорид цинку	ГОСТ 4529-78	Масова доля не менше 98%	Для кристалізації
3. Матеріали:			
3.1. Губки	ГОСТ Р 50962-96	Зовнішній вигляд	Для мийки посуду, обладнання
3.2. Гумові рукавички	ГОСТ 20010-93	Зовнішній вигляд	Для персоналу
3.3. Гумовий фартук	ГОСТ 12.4.029-76	Зовнішній вигляд	Для персоналу
3.4. Електроди	ГОСТ 16287-77	Зовнішній вигляд	Для виміру рН
3.5. Етикетки	ТУ 9571-002-14350732-2006	Зовнішній вигляд	Для маркування
3.6. Картриджі	ГОСТ ISO 8537-2011	Стерильність, зовнішній вигляд	Для первинної упаковки
3.7. Ковпачки	ГОСТ 19324-80	Зовнішній вигляд	Для закупорювання картриджів
3.8. Колби	ГОСТ 1770-74	Згідно вимог	Для культивування музейної культури
3.9. Коробки	ГОСТ 9142-90	—	Для пакування

3.10. Мікробіологічні петлі	ГОСТ 2916991	Згідно вимог	Для пересівання культури
3.11. Піпетки різних об'ємів	ГОСТ 29227-91	Згідно вимог	Лабораторний посуд
3.12. Пробірки	ГОСТ 1770-74	Згідно вимог	Для культивування музейної культури
3.13. Пробки	ГОСТ 7851-74	Згідно вимог	Для закупорювання пробірок
3.14. Спецодяг	ГОСТ 12.4.280- 2014	Зовнішній вигляд	Для персоналу
3.15. Флакони	ГОСТ Р 53416- 2009	Згідно вимог	Упаковка
3.16. Чашки Петрі	ГОСТ 23932-90	Згідно вимог	Лабораторний посуд

4.3. Опис технологічного процесу

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

Неякісне виконання санітарної підготовки впливає на багато факторів, такі як якість продукції, перевезення та зберігання, а також впливає на працівників і піддає ризику їх здоров'я.

ДР 1.1. Підготовка води очищеної та води для ін'єкцій

Воду очищену використовують для виготовлення лікарських препаратів, при виробництві яких до води не висувають вимоги щодо стерильності та/або апірогенності. Воду очищену отримують шляхом дистиляції, іонного обміну або іншим підходящим способом з води, що відповідає вимогам затверджених компетентним уповноваженим органом нормативних документів стосовно якості води, призначеної для споживання людиною. При промисловому очищенні води і її зберіганні в якості сировини для лікарських препаратів виробник зобов'язаний здійснювати контроль над концентрацією в рідині аеробних мікроорганізмів:

- норма для води очищеної – 100 життєздатних аеробних мікроорганізмів на 1 мл рідини;
- для води для ін'єкцій і високоочищеної води норма – 10 життєздатних аеробних мікроорганізмів на 100 мг рідини [45].

ДР 1.1.1. Груба очистка води

Груба очистка необхідна, щоб потім перейти до наступного етапу, більш тонкої очистки. Воду пропускають через фільтри грубої очистки для видалення грубих дисперсних частин, такі як пісок, іржа, глина, волокна та інші механічні домішки. Використовують сітчасті фільтри для затримки частинок розмірами від 20 до 300 мкм.

ДР 1.1.2. Іонний обмін

Іонний обмін відбувається на іонообмінних установках – конструктивно це колони, заповнені іонообмінними смолами. Вихідна вода подається через колони знизу до верху, просочується спочатку через шар катіоніту, потім аніоніту. Частинки іонообмінних смол, що потрапили у воду, фільтруються. Якість води контролюється електропровідністю. Іонобмінна технологія є класичною і досить економічним методом знесолення води. Один кілограм смоли здатний очистити щонайменше 1000 літрів води.

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ док-м.	Підпис	Дата		57

ДР 1.1.3. Зворотній осмос

Склад стандартної установки зворотного осмосу: насос високого тиску, декілька перміаторів та блок регулювання робочого режиму. Матеріалом для зворотноосмотичної мембрани можуть служити ефіри целюлози - ацетати або поліефіри - найлон. Мембрана з діаметром пор 0,01 мкм повністю звільняє воду від розчинних солей, органічних речовин, колоїдів і мікробів [45].

ДР 1.2. Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів

Дезінфекцію проводять для знищення патогенних мікроорганізмів та виключення можливості контамінації продукту. Приготування миючих та дезінфікуючих речовин здійснюється строго за правилами техніки безпеки.

ДР 1.2.1. Приготування розчину миючого засобу

На біотехнологічних та хімічних виробництвах при масовій обробці значних об'ємів, поверхонь обладнання та інвентарю, при обробці виробничних приміщень віддають перевагу економічно вигідним та достатньо ефективним дезінфікуючим речовинам. Найчастіше використовують “Біолот” та “Еколаб”.

Їх готують розведенням 2 і 3 г відповідно до 1 л води.

ДР 1.2.2. Приготування розчину Хлораміну Б

Хлорамін має бактерицидні, віруліцидні і спороцидні властивості, особливо в кислому і нейтральному середовищі. Він бактерицидний проти вегетативних форм в концентрації 0,25 - 0,5 % і температурі 30°C, спороцидний – при 50-60°C. Водний розчин з масовою часткою хлораміну Б (монохлораміну Б) від 0,3 до 3% використовують для обробки боксів, прилеглих приміщень, виробничих приміщень, а в технологічних приміщеннях місць, куди потрапляють компоненти поживного середовища чи культуральна рідина.

Хлорамін Б – бензосульфохлорамід натрію – білий кристалічний порошок, який готують розведенням: 1 л хлораміну до 20 л води. Містить 25-29% активного хлору (ВТУ 27/24-79-65).

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
						58
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

ДР 1.2.3. Приготування розчину етилового спирту 76%

Щоб приготувати 1 л спирту 76%, потрібно 800 мл етилового спирту 96% і 221 мл води очищеної. Після розведення в нержавіючій ємності обов'язково фільтрують.

ДР 1.3 Підготовка одягу

При визначенні способу очищення спецодягу слід враховувати особливості його експлуатації. Наприклад, утеплений одяг та одяг, оброблений спеціальними речовинами прати та прасувати заборонено [46].

ДР 1.3.1. Прання одягу

Прання здійснюють в спеціальних приміщеннях, в залежності від виду забруднення рекомендована температура – 30-60°C. Також використовують миючі засоби, які добре піняться.

ДР 1.3.2. Сушіння одягу

Сушка спеціального одягу проводиться за допомогою кулісних сушарок, барабанів (сушильних) і конвеєрів сушарок, які мають безперервну дію протягом 120 хв при температурі 90 °C.

ДР 1.3.3. Упаковка одягу

Кожний комплект спецодягу прасують з двох сторін, упаковують в одноразові пакети і передають на стерилізацію.

ДР 1.3.4. Стерилізація одягу

Спецодяг стерилізують в автоклаві при температурі 120 °C, тиск 0,11 МПа протягом 30-45 хвилин. На пакетах з одягом вказують дату стерилізації і передають в передбюкс.

ДР 1.3.5. Зберігання одягу

В приміщеннях, де зберігається одяг температура має бути не нижче 10°C та не вище 30°C при відносній вологості повітря 50-70%. Простерилізований одяг може зберігатися 2 доби.

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		59

ДР 1.4. Санітарна підготовка персоналу

Персонал повинен дотримуватися санітарних норм і не мати шкідливих звичок. Повинні новини чистий і придатний для роботи одяг, які при необхідності треба змінювати. Чітко контролюється вхід та вихід у виробничі приміщення. В гардеробі персонал знімає верхній одяг та взуття та вдягає змінне взуття і одяг. В передбоксі залишає особисті речі в індивідуальній шафі, одягає особисте взуття та йде до першої вмивальні, де мие руки туалетним милом, витирає насухо і обробляє дезрозчином. Вдягає спеціальний одяг та бахіли і йде до другої вмивальні, де ще раз обробляє руки дезрозчином та вдягає одноразові стерильні рукавички. Кожні 2 години ці рукавички обробляють 76% етиловим спиртом [46].

ДР 1.4.1. Навчання та перевірка знань персоналу

Коли персонал допускається на виробництво, має пройти інструктаж з охорони праці, техніки безпеки, ознайомитися ж пожежною та електробезпекою. Необхідно регулярно проводити навчання персоналу силами кваліфікованих спеціалістів з відділу охорони праці. Потрібно вести протоколи інструктажів. Раз в рік проводяться повторні інструктажі.

ДР 1.5. Підготовка виробничих приміщень

Дезінфекцію та прибирання виробничих приміщень проводять в спеціально відведених гумових рукавичках, чоботах та гумовому фартусі, якщо треба ще використовують респіратор. Стіни і стеля мають не піддаватися корозії, їх чистять і миють миючими засобами. Підлога з гладкою поверхнею, без вибоїн і щілин. Кожного року приміщення піддаються ремонтним роботам. Прибирання з дезінфекцією ділять на щоденне та генеральне.

ДР 1.5.1. Щоденне прибирання

Вологе прибирання проводять за 1,5-2 год до початку роботи. Стіни, двері миють засобом “Хлорамін”. Ним же миють підлогу. При обробці боксу

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
						60
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

застосовують 76% етиловий спирт, але через 30-40 хв залишок видаляють стерильною тканиною.

ДР 1.5.2. Генеральне прибирання

Генеральне прибирання проводять раз на 5 днів миючими та дезінфікуючими засобами. Після прибирання для уникнення контамінації вмикають бактерицидні лампи.

ДР 1.6. Підготовка обладнання

Перед роботою обладнання перевіряється на дефекти.

ДР 1.6.1. Мийка та дезінфекція обладнання

Обладнання промивають водою упродовж двох хвилин, обробляють миючими та дезінфікуючими засобами. У випадку, коли на обладнанні присутні забруднення проводять миття розчином кислоти 1% при 20°C.

ДР 1.6.2. Ополіскування обладнання

Ополіскування проводять “очищеною” – демінералізованою або пом’якшеною водою.

ДР 1.6.3. Стерилізація обладнання

Стерилізація проводиться гострою парою, при температурі 110°C, тиск 0,2 МПа упродовж 1,5 години з подальшим охолодженням упродовж 3,5 год.

ДР 2. Підготовка повітря

Як правило в біотехнології питання технологічного повітря асоціюються з його функціями при біосинтезі. Технологічне аераційне повітря є джерелом лімітуючого субстрату – кисню і є джерелом енергії при перемішуванні культуральної рідини [47].

ДР 2.1. Забір повітря з атмосфери

Як правило забір повітря проводиться з атмосфери за допомогою трубчастих конструкцій висотою 8-10 м. Висота труби – 10 м, діаметр труби 300 мм. Труба розташовується в місцях з мінімальною запиленістю та загазованістю.

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ док-м.	Підпис	Дата		61

Очистка ведеться з початку при заборі повітря. Повітря проходить крізь решітку встановлену у повітропроводі для видалення крупних механічних часток – листя гілки та ін.

ДР 2.2. Попереднє очищення від механічних часток

Шляхом інерційного осадження очищають повітря від великих часток розміром більше 5 мкм. Фільтр має 10-15 шарів сітки або перфорованих листів з металу або вініпласту. Ефективність очищення повітря в таких фільтрах становить 70-85%, пилоємність 200-400 г/м², продуктивність 0,43-0,610 м³/с.

ДР 2.3. Стиснення повітря

Атмосферне повітря попередньо очищене від механічних часток пилу, а потім стискають до потрібного тиску і направляють у систему повітропостачання. Компресор здійснює адіабатне стискання повітря до тиску 0,2 МПа, в наслідок чого повітря може розігріватися більше ніж до 100-120°C.

ДР 2.4. Охолодження повітря

Для охолодження повітря при виході з компресора необхідно ставити теплообмінник, так як процес ферментації припускає подачу повітря з температурою не більше 40°C. Використовують, як правило, теплообмінники трубчастого типу. Для охолодження повітря в теплообміннику використовують воду.

ДР 2.5. Стабілізація потоку повітря

Для стабілізації потоку повітря і попередження його пульсацій потрібно мати «ланцюг затримки» цю роль може виконувати місткість – ресивер. Основне призначення ресиверу – згладжування пульсацій у тиску при роботі компресійного обладнання та видалення крапельної вологи.

ДР 2.6. Очищення повітря на головному фільтрі

Для очищення використовують глибинні набивні фільтри періодичної дії. Заміна фільтруючого матеріалу проводиться 2 рази на рік. Як правило в якості

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
						62
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

фільтруючого матеріалу використовують скловолокно з діаметром 7-21 мкм. Даний фільтр стерилізують гострою та глухою парою протягом 4 годин при тиску 0,12-0,15 кПа. Ефективність очистки – 90-99% [47].

ДР 2.7. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

В даних фільтрах використовують папір з базальтових супертонких волокон, гофрований базальтовий картон, різні фторпластикові елементи, а також поширено використовують тканину Петрянова. Фільтри тонкої очистки практично забезпечують 100%-ну очистку і стерилізацію повітря. Вони стерилізуються гострою парою в технологічній обв'язці з ферментером без видалення фільтруючих елементів з корпусу фільтра [47].

ДР 3. Підготовка флаконів та картриджів

ДР 3.1. Мийка та ополіскування флаконів та картриджів

Перед мийкою флаконів вони переглядають на наявність дефектів. Флакони миють з миючими засобами при температурі 60°C протягом 30 хв. Іноді використовують машини роторного або лінійного типу. Ополіскують спочатку теплою, потім холодною водою. Останнє ополіскування здійснюють водою для ін'єкцій.

ДР 3.2. Висушування та стерилізація флаконів та картриджів

Для сушіння флаконів використовують сухо-жарові шафи, температура приблизно 50°C, сушать протягом 20-30 хв. Температура в зоні стерилізації 360°C, на виході - 23°C. Стерилізують 1 год.

ДР 4. Підготовка пробок та ковпачків

Використовують поліфункціональні машини, які поєднують всі операції мийки, стерилізації, сушіння (фірма DGM)

ДР 4.1. Миття пробок і ковпачків

Пробки і ковпачки миють з миючими засобами при температурі 60°C протягом 30 хв.

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		63

ДР 4.2. Ополіскування та сушіння

Ополіскують спочатку теплою, потім холодною водою. Сушать в сушильній шафі при температурі 50°C протягом 20-30 хв.

ДР 4.3. Стерилізація пробок та ковпачків

Стерилізують під тиском при температурі 120°C 20 хв.

ДР 5 Підготовка лабораторного посуду

ДР 5.1. Миття посуду

Миття посуду проводять вручну, використовуючи миючі засоби при температурі 40-60°C.

ДР 5.2. Ополіскування посуду

Ополіскування проводять водою очищеною при температурі 30-40°C.

ДР 5.3. Сушіння посуду

Для сушіння використовують сушильні шафи, температура 60°C.

ДР 5.4. Стерилізація посуду

Стерилізацію проводять в автоклаві, температура 120°C, 30-40 хвилин.

ДР 6. Приготування піногасника

Використовують Пропінол Б-400. Це суміш поліоксіпропіленгліколевих ефірів н-бутилового спирту, які отримують при взаємодії бутилату калію з оксидом пропілену. Готують у відповідності до ТУ 6-14-300-80. Його вносять з розрахунку 0,2 г на 1 кг поживного середовища [48].

ДР 6.1. Стерилізація піногасника

Стерилізують насиченою парою протягом 1 години при температурі 110-120°C.

ДР 6.2. Охолодження піногасника

Охолоджують до температури 36°C і подають у ферментер.

ДР 7. Приготування буферних хроматографічних розчинів

ДР 7.1. Приготування буферів для іонообмінної хроматографії

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
						64
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

Щоб приготувати буфер у очищеній воді розчиняють 10мМ лимонної кислоти та додають 30% розчин пропанолу.

ДР 7.2. Приготування буферів для вискоєфективної рідинної хроматографії

Для приготування буферу треба вода очищена, 0,02М амоній ацетат та 50% пропанол.

ДР 8. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 8.1. Приготування середовища Ейкмана

Глюкозо-пептоне середовище (Ейкмана) – це живильне середовище для культивування *E.coli*. Якісний склад середовища являє собою живильну базу для зростання бактерій, забезпечуючи їх усіма необхідними речовинами, в якості джерела вуглецю включено глюкозу. До складу середовища входить вода очищена 1 л, хлорид натрію 50 г, глюкоза 100 г і пептон 100 г. Компоненти середовища перемішуються у реакторі, який має лопатеву мішалку та сорочку для обігріву. Робочий об'єм – 1м³. Коефіцієнт заповнення 0.7. Тиск умовний 0,6 МПа. Швидкість мішалки 24-30 об/хв. Потужність привода мішалки 0,37 кВт [50].

ДР 8.1.1. Стерилізація середовища

Стерилізація періодична, проводяться в реакторі при температурі 135°C, витримку її при цій температурі протягом години та охолодження за допомогою пластинчастого або кожухотрубного теплообмінника до температури 35-38°C.

ДР 8.2 Приготування основного поживного середовища

Склад середовища представлений гідролізатом казеїну солянокислотним 30 г/л, екстрактом пекарських дріжджів 14 г/л, двозаміщений фосфатом калію 6 г/л, однозаміщеним фосфатом калію 3 г/л, сульфатом магнію 0,5 г/л, натрій хлористий 5 г/л, глюкоза 30 г/л, ампіцилінова натрієва сіль 0,05 г/л. Вода до 1 л.

Змішування проводиться в виробничому реакторі, об'ємом 1 м³. Коефіцієнт заповнення 0.7. Тиск умовний 0,6 МПа. Використовується лопатева мішалка.

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ док-м.	Підпис	Дата		65

Швидкість мішалки 24-30 об/хв. Потужність привода мішалки 0,37 кВт [50]. рН середовища приблизно 7-7,2, вирівнюють за допомогою натрій гідроксиду.

ДР 8.2.1. Стерилізація та охолодження основного поживного середовища

Стерилізація відбувається періодично при температурі 120-130 °С, тиск умовний 0,2МПа протягом 45 хв. Охолоджують за допомогою теплообмінників до 35-38 °С.

ТП 9. Підготовка посівного матеріалу E. coli

ТП 9.1.Відновлення музейної культури

Культуру висівають в пробірки на середовище Ейкмана та поміщають в термостат на 28 °С протягом 10 годин.

ТП 9.2. Культивування культури в колбах

Культуру культивують глибинно в колбах на 100 мл у термостатичній качалці протягом 12 годин при температурі 37 °С [51].

ТП 9.3. Культивування культури в інокуляторі

Культуру культивують в інокуляторі при температурі 37 °С, рН=6,9±0,2, тривалість 8 год, рО₂=40±15%.

ТП 10. Виробниче культивування E.coli JM109/pHINS05

Вирощування основної культури проводять в ферментері ємністю 150л х90 л поживного середовища. Об'єм інокулята – 10 л. Культивування проводять при наступних параметрах: температура 36,5±0,5°С, рН 6,7-7,1; рО₂=40±15%, аерація 2 л/хв. Під час ферментації кожні 30 хвилин відбирають проби для вимірювання оптичної щільності культуральної рідини на спектрофотометрі при довжині хвилі 540 нм. В середині логарифмічної фази при оптичній щільності 7-9 одиниць вносять індуктор – 1-ізопропіл-β-D-тіогалактопіранозид. Культивування продовжують до утворення внутрішньоклітинних включень гібридного білку у 90-95% клітин [51].

ТП 11. Сепарація клітин

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
						66
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

Ріст культури в ферментері зупиняють шляхом різкого зменшення інтенсивності перемішування, культуру охолоджують до 10-14 °С і концентрують на сепараторі в 8-10 разів.

ТП 12. Руйнування клітин

В отриману суспензію додають трис-основний до концентрації 0,1М, сечовину до 1,5М, ЕДТА до 1мМ. Потім її пропускають тричі через гомогенізатор при тиску 700-800 атм і температурі 15-20 °С, при цьому здійснюється руйнування клітин [49].

ТП 13. Відділення осаду центрифугуванням

Гомогенат клітин пропускають через проточну центрифугу ($g=18\,000$). Основна маса тілець включень (не менше 90%) осаджується в роторі центрифуги. Вологий осад тілець включень (2,6 кг) вигружають з ротору центрифуги, заморожують при -40 °С.

ТП 14. Рефолдинг проінсуліну

Дана стадія застосовується з метою формування дисульфідних зв'язків. Головні компоненти буферу для рефолдингу включають гліцин в концентрації приблизно від 0,5 мМ до 20 мМ; ЕДТА приблизно від 0,1 мМ до 5мМ; гліцерин - приблизно від 1% до 20%. Процес рефолдингу проводиться при температурі приблизно від 4 до 24 °С, переважно при 10 °С. Час інкубації в загальному становить приблизно від 2 до 20 годин, переважно близько 6 годин [51].

ТП 15. Ферментативний гідроліз гібридного білку

Клітинна маса надходить до реактору. Руйнування відбувається при одночасній обробці трипсином та карбоксипептидазою Б. Трипсин використовується в концентрації від 1: 200 до 1: 20 000, в той час як карбоксипептидаза Б використовується в концентрації від 1: 100 до 1: 5000. рН приблизно 10,5; температура інкубації 6 °С, час інкубації – приблизно 14 годин.

ТП 16. Кристалізація

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		67

Процес відбувається у кристалізаторі при додаванні очищеної води, лимонної кислоти 50 мМ та 10% ZnCl 1,5Мм. Для значення рН 7,5 додають гідроксид натрію. Далі додають соляну кислоту для значення рН 6 і перемішують лопатевою мішалкою 12 год [52].

ТП 17. Фільтрування

Процес фільтрування проводять на друк-фільтрі, щоб відділити кристали. Далі їх промивають 0,9% розчином солі і вивантажують у збірник. В кінці виходять кристали інсуліну чистотою 80%.

ТП 18. Іонообмінна хроматографія

Процес відбувається в іонообмінному реакторі, в якому знаходиться іонообмінний сорбент. Для даного хроматографічного очищення використовують буферні розчини такого складу: 10мМ лимонної кислоти та додають 30% розчин пропанолу. Спочатку відбувається суспендування кристалів у розчині пропанолу, потім додають соляну кислоту 2М для кислого рН. Коли інсулін розчинився, подають на хроматографічну колону, потім промивають 150 л буферного розчину. Елюювання інсуліну здійснюють, використовуючи бінарний лінійний градієнт по концентрації натрію хлориду від 10 до 300 мМ протягом 2,5 годин. За необхідності, сорбент регенерують раз в 8-10 циклів 0,5 М розчином гідроксиду натрію [51].

ТП 19. Кристалізація

Аналогічно до стадії ТП 16.

ТП 20. Фільтрування

Аналогічно до стадії ТП 17.

ТП 21. Високоєфективна рідинна хроматографія

Для даного процесу використовують сталеві колони, які являють собою трубку, заповнену нерухомою фазою та закрити з обох боків перехідниками. Тиск колонок приблизно 70 атм. За один раз очищають 1,3 кг інсуліну. За допомогою

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		68

насосу розчин інсуліну перекачують на хроматографічну колону, яку промивають буферним розчином, який складається з води очищеною, 0,02М амоній ацетату та 50% пропанолу. Елюювання інсуліну здійснюють, використовуючи градієнт по концентрації пропанолу від 17 до 25% протягом 2,5 годин. За необхідності, сорбент регенерують 50мМ розчином гідроксиду натрію в зворотньому потоці [51].

ТП 22. Кристалізація

Аналогічно до стадії ТП 16.

ТП 23. Фільтрування на друк-фільтрі

Аналогічно до стадії ТП 17.

ТП 24. Сублімаційна сушка кристалів інсуліну

Даний процес проводиться в спеціальних реакторах при температурі -40-20°C протягом 15 год при абсолютному вакуумі. Спочатку інсулін заморожується, а потім подають тепло і лід сублімує [52].

ТП 25. Приготування розчину інсуліну

Інсулінові кристали розчиняють у воді для ін'єкцій, додають допоміжні речовини [51].

ТП 26. Розлив у картриджі та флакони

Розлив у флакони та картриджі відбувається автоматизовано в асептичних умовах. В картриджі розливають по 3 мл, де на 1 мл розчину припадає по 100 МО. Потім закупорюють резиновими пробками з обох сторін.

У флакони наливають по 5 або 10 мл розчину, закупорюють гумовою пробкою і поверх обкатують алюмінієвими ковпачками. На флакони наклеюють етикетки, на яких зазначають дату виготовлення, активність розчину, термін зберігання, умови зберігання та ін.

ТП 27. Контроль якості готової продукції

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		69

Під час контролю якості відбувається встановлення відповідності продукції по кількісним та якісним характеристикам, виявлення дефектної продукції на ранніх етапах та запобігання випуску недоброякісної продукції. Головна задача контролю якості – не допустити появу браку та дефектів до встановлених вимог [53].

ПМВ 28. Пакування картриджів та флаконів у коробки

Упаковують по 5 картриджів в блістерну упаковку і потім у картонну упаковку.

По 1 флакону в картонну упаковку. Коробки відправляють на склад.

ПВ 29. Переробка відходів

В основному на даній стадії переробляються рідкі відходи, які наприклад застосовувалися для миття та ополіскування посуду, обладнання та ін. і які або не містять токсичних речовин або містять їх у малих концентраціях. Перед тим як злити їх у каналізацію, розводять великою кількістю водопровідної води для того, щоб встановити допустимий вміст шкідливих речовин (ГДК) [54].

Для реагентів, які використовуються у технологічному процесі проводять регенерацію і знову використовують у виробництві.

ЗВ 30. Знешкодження відходів

На цій стадії відбувається знешкодження та обробка повітряних та рідких викидів після більшості технологічних операцій, таких як підготовка повітря, сублімаційна сушка, після етапів культивування та ін. Ці процеси забезпечують екологічну чистоту виробництва.

Відпрацьоване повітря очищується в основному за допомогою скрубєрів Вентури, які є достатньо ефективними та економічно вигідними. Принцип роботи скрубєра заснований на аеродинамічній силі труби Вентури. Вона являє собою трубу, схожу на пісочний годинник. Труба включає в себе: дифузор, горловину, конфузор і штуцера підведення зрошувальної рідини з форсунками. Принцип

роботи доволі простий. Через фланець вхідного газу в трубу Вентури потрапляє забруднений газ. У трубі газ розганяється до великих швидкостей відповідно до закону Бернуллі. Зверху, через форсунки надходить вода. За рахунок утворення турбулентності, вода в трубі дробиться на більш дрібні краплі. За рахунок дроблення збільшується площа зіткнення води з газом, тобто площа фільтрації. Таким чином відбувається уловлювання забруднень водою або спеціальною рідиною. Потім вода з газом проходить по газоходу в відцентровий каплеуловлювач. У ньому вода з газом опускається вниз, а чисте повітря за допомогою вентилятора виходить назовні [55].

Що стосується відходів після культивування, то залишки розводять водою та автоклавують при температурі 120°C, а далі подають до інших виробничих відходів.

4.4. Матеріальний баланс

Таблиця 4.2. Матеріальний баланс стадії

Використано				Отримано			
Назва сировини, матеріалів, напівпродуктів	Кількість			Назва сировини, матеріалів, напівпродуктів	Кількість		
	кг	шт	л		кг	шт	л
Стадія ТП 9.3							
Гідролізат казеїну солянокислотний			30	Посівний матеріал			99,568
Екстракт пекарських дріжджів			14	Відпрацьоване повітря			1440
Двозаміщений фосфат калію			6	Втрати (2%)			2,032

Однозаміщений фосфат калію			3				
Сульфат магнію			0,5				
Натрій хлористий			5				
Глюкоза			30				
Ампіцилінова натрієва сіль			0,05				
Вода очищена			1,45				
Посівний матеріал			10				
Технологічне стерильне повітрям			1440				
Натрій гідроксид			1				
Піногасник			0,5				
Контроль показників			0,1				
Всього:			1541,6	Всього:			1541,6

Стадія ТП 10.

Посівний матеріал			99,568	Культуральна рідина			5428,778
Основне поживне середовище			5200	Відпрацьоване повітря			45000
Піногасник			100	Втрати (2%)			110,79
IPGT			100				
Технологічне стерильне повітря			45000				
Гідроксид амонію			30				

Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата

ДП 6113. 00.000 ПЗ

Арк.

72

Контроль показників			10				
Всього:	50539,568			Всього:	50539,568		

4.5. Контроль виробництва

Таблиця 4.3. Перелік контрольних точок

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
ДР 1.1. Підготовка води очищеної та води для ін'єкцій К _т 1.1.1. К _{мб} 1.1.1.	Мікробіологічні та органолептичні показники	Фолоколориметрія, LAL-тест	Кожну операцію	Відповідно до вимог
ДР 1.2. Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів К _т 1.2.1.	Миючі властивості	Візуально, ваги, мірний посуд	Кожну операцію	Відповідно до вимог
К _х 1.2.2.	Етиловий спирт	Ваги, мірний посуд	Кожну операцію	76%
ДР 1.3. Підготовка одягу К _т 1.3.1.	Чистота та цілісність одягу	Візуально	Кожну операцію	—
ДР 1.5. Підготовка виробничих приміщень К _{мб} 1.5.1.	Наявність бактерій	Висів на чашки Петрі	Кожну операцію	Не більше $3,5 \cdot 10^6$

К _{мб} 1.5.2.	Концентрація бактерій	Висів на чашки Петрі, кварцування	Кожну операцію	—
ДР 1.6. Підготовка обладнання К _т 1.6.1.	Концентрація бактерій	Висів на чашки Петрі	Кожну операцію	Не більше $3,5 \cdot 10^6$ КУО
К _т 1.6.2.	Температура, тривалість, тиск	Регулятор температур, годинник, манометр	Кожну операцію	110°C 1,5 год 0,2 МПа
К _{мб} 1.6.1.	Мікробіологічна чистота	Висів на чашки Петрі	Кожну операцію	Відсутність контамінуючої мікрофлори
ДР 2. Підготовка повітря К _т 2.1.	Вміст часток	Пробовідбірник	Кожну операцію	КУО не більше 3,5 млн/м ³
К _т 2.2.	Вологість	Психрометр	Кожну добу	75%
К _т 2.3.	Температура	Термометр		40°C
ДР 3. Підготовка флаконів та картриджів К _т 3.1	Флакони та картриджі	Візуально	Кожну операцію	Відсутність дефектів
К _{мб} 3.2.	Мікробіологічна чистота	Висів на чашки Петрі	Кожну операцію	Відсутність контамінантів
К _т 3.3.	Температура, тривалість, стерилізація	Термометр, годинник	Кожну операцію	360°C, 1 год
ДР 4. Підготовка пробок та ковпачків К _т 4.1.	Пробки і ковпачки	Візуально	Кожну операцію	Відсутність дефектів

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП 6113. 00.000 ПЗ

Арк.

74

К _т 4.2.	Мікробіологічна чистота, температура, тривалість стерилізації	Висів на чашки Петрі, термометр, годинник	Кожну операцію	Відсутність контамінантів, температура 120°C 20 хв
ДР 5. Підготовка лабораторного посуду К _т 5.1.	Лабораторний посуд	Візуально	Кожну операцію	Відсутність дефектів
К _т 5.2.	Мікробіологічна чистота, температура, тривалість стерилізації	Висів на чашки Петрі, термометр, годинник	Кожну операцію	Відсутність контамінантів, температура 120°C, 30-40 хвилин
ДР 6. Приготування піногасника К _х 6.1.	Концентрація	Ваги, мірний посуд	Кожну операцію	Згідно вимог
К _{мб} 6.2.	Мікробіологічна чистота, температура	Висів на чашки Петрі, термометр	Кожну операцію	Відсутність контамінантів, 20-30°C
ДР 7. Приготування буферних хроматографічних розчинів К _х 7.1.	Концентрація	Ваги, мірний посуд	Кожну операцію	Згідно вимог
К _{мб} 7.2.	Мікробіологічна чистота	Висів на чашки Петрі	Кожну операцію	Відсутність контамінантів
ДР 8. Приготування та стерилізація поживних середовищ К _х 8.1.	Склад середовища	Ваги, лабораторний посуд	Кожну операцію	Відповідно до НТД
К _{мб} 8.2.	Мікробіологічна чистота	Висів на чашки Петрі	Кожну операцію	Відсутність контамінантів

К _Т 8.3.	Рівень pH	pH-метр	Кожну операцію	7-7,2
К _Т 8.4.	Режим стерилізації, температура, тиск, тривалість	Термометр, манометр, годинник	Кожну операцію	Температура 120-130 °С, тиск умовний 0,2МПа протягом 45 хв
ТП 9. Підготовка посівного матеріалу E. coli К _{мб} 9.1.	Мікробіологічна чистота	Висів на чашки Петрі	Кожні 3 години	Відсутність контамінантів
К _Т 9.2.	Тривалість, температура	Годинник, термометр	—	Від 8 до 12 год
К _Т 9.3.	Витрати повітря та поживного середовища	Витратомір	Під час процесу	pO ₂ =40±15%, 5 л/год
ТП 10. Виробниче культивування E.coli JM109/pHINS05 К _{мб} 10.1.	Мікробіологічна чистота	Висів на чашки Петрі, мікроскопіювання	Під час процесу	Відсутність контамінантів
К _Т 10.2.	pH	pH-метр	Під час процесу	6,7-7,1
К _Т 10.3.	Температура	Термометр	Під час процесу	36,5±0,5°С
К _Т 10.4.	Тривалість	Годинник	Кожну операцію	Від 8 до 18 год
К _Т 10.5.	Тиск	Манометр	Кожну операцію	0,1 МПа
К _Т 10.6.	Витрати повітря	Витратомір	—	pO ₂ =40±15%
К _{мб} 10.7.	Оптична щільність	Спектрофотометр	Кожні 30 хв	4-6-одиниць

Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата

ДП 6113. 00.000 ПЗ

Арк.

76

К _т 10.8.	Утворення піни	Візуально	Під час процесу	Відсутність великої кількості піни
ТП 11. Сепарація клітин К _т 11.1.	Оптична густина культурально ї рідини	Спектрофотоме трія	Кожну операцію	При 540 нм становить 0,95-1
ТП 12. Руйнування клітин К _т 12.1.	Накопичення тілець- включень	Мікроскопіюва ння	Кожну операцію	—
ТП 13. Відділення осаду центрифугуван ням К _т 13.1.	Оптична густина	Спектрофотоме трія	Кожну операцію	При 540 нм становить 1- 1,5
ТП 14. Рефолдинг проінсуліну К _т 14.1.	Концентраці я білку	Мікроскопіюва ння, біуретовий метод	Кожну операцію	50 мг/мл
К _т 14.2.	Температура Тривалість	Термометр Годинник	Кожну операцію	10 °С 6 год
ТП 15. Ферментативн ий гідроліз гібридного білку К _т 15.1.	Рівень рН Температура Тривалість	рН-метр Термометр Годинник	Кожну операцію	рН 10,6 6 °С 14 годин
ТП 16. Кристалізація К _т 16.1.	Рівень рН Тривалість	рН-метр Годинник	Кожну операцію	рН 7 12 годин
ТП 17. Фільтрування К _т 17.1.	Тиск	Манометр	Кожну операцію	70 кПа

ТП 18. Іонообмінна хроматографія К _Т 18.1.	Буфер Вміст основних компонентів	Ваги, мірний посуд	Кожну операцію	Згідно вимог
К _Т 18.2.	pH розчину	pH-метр	Кожну операцію	pH 3
К _Т 18.3.	Ступінь очистки	Електрофорез	Кожну операцію	Не нижче 90%
ТП 19. Кристалізація К _Т 19.1.	Рівень pH Тривалість	pH-метр Годинник	Кожну операцію	pH 6 12 годин
ТП 20. Фільтрування К _Т 20.1.	Тиск	Манометр	Кожну операцію	70 кПа
ТП 21. Високоєфектив на рідинна хроматографія К _Т 21.1.	Буфер Вміст основних компонентів	Ваги, мірний посуд	Кожну операцію	Згідно вимог
К _Т 21.2.	pH розчину	pH-метр	Кожну операцію	pH 3
К _Т 21.3.	Ступінь очистки	Електрофорез	Кожну операцію	96%
ТП 22. Кристалізація К _Т 22.1.	Рівень pH Тривалість	pH-метр Годинник	Кожну операцію	pH 6 12 годин
ТП 23. Фільтрування К _Т 23.1.	Тиск	Манометр	Кожну операцію	70 кПа
ТП 24. Сублімаційна сушка кристалів інсуліну К _Т 24.1.	Температура Тиск	Термометр Манометр	Кожну операцію	-40+20 °C 50-70 Па
К _Т 24.2.	Вологість	Ваги, мірний посуд	Кожну операцію	1-2%

ТП 25. Приготування розчину інсуліну К _{мб} 25.1.	Мікробіологі чна чистота	Висів на чашки Петрі	Кожну операцію	Відсутність контамінанті в
К _т 25.2.	Концентраці я	Фотоколоримет рія	Кожну операцію	—
ТП 26. Розлив у картриджі та флакони К _т 26.1.	Герметичніст ь	Вакуум метод	Кожну операцію	—
К _т 26.2.	Наповнення	Візуально	Кожну операцію	—
ТП 27. Контроль якості готової продукції. К _{мб} 27.1.	Мікробіологі чна чистота	Висів на чашки Петрі	Кожну операцію	Відсутність контамінанті в
К _т 27.2.	Колір та зовнішній вигляд	Візуально	Кожну операцію	Суспензія білого кольору
ПМВ 28. Пакування картриджів та флаконів у коробки К _т 28.1.	Зовнішній вигляд	Візуально	Кожну операцію	Суспензія білого кольору

4.6. Технологічна схема виробництва

Технологічна схема виробництва рекомбінантного інсуліну людини в картриджах наведена аркуші формату А1

ДП 6113. 01.000 ТК.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 4

Цільовим продуктом є гормон інсулін в вигляді суспензії білого кольору, фасування відбувається в флакони або картриджі по 3 та 5 мл відповідно. Надано характеристику сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві. Описано технологічний процес отримання кінцевого продукту, який складається з допоміжних робіт, стадій основного технологічного процесу, стадії пакування та маркування, переробки та знешкодження відходів. Розраховано матеріальний баланс стадій ТП 9.3 та ТП 10 та перераховано перелік контрольних точок на кожній стадії, щоб забезпечити повну асептичність виробництва та уникнути контамінації на виробництві.

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		80

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Для даного дипломного проекту було обрано розробку ферментера для стадії підготовки посівного матеріалу для виробництва рекомбінантного інсуліну людини клітинами *E. coli JM109/pHINS05*.

На сьогоднішній день відома значна кількість класифікацій ферментерів, в яких враховуються різні конструктивні, експлуатаційні та технологічні особливості. В більшості випадків ферментери класифікують по засобу введення енергії, так як енергетичні чинники обумовлюють гідродинамічні та масообмінні показники. Існують три основні засоби введення енергії в поживне середовище. Ця класифікація придатна для рідкофазних аеробних або анаеробних біотехнологічних процесів. Недоліком цієї класифікації є те що вона не враховує ряд технологічних особливостей процесу:

- рівень асептики;
- вид технологічного процесу – періодичне, напівбезперервне або безперервне культивування;
- рівень сегрегації фаз – використання іммобілізованих клітин, біоплівок, флокул та інше.

Класифікація ферментерів за способом введення енергії дозволяє згрупувати їх в блоки для яких можна розробити єдині методики інженерного розрахунку основних конструктивних елементів і режимів роботи. [47]

					ДП 6113. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив	Лемішко Ю.К.						81	
Консульт.								
Керівник	Карпенко Ю.В.					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Затверд.								

Як правило, під час попереднього вибору ферментеру користуються схемою у відповідності з якою ферментери розділені по принципу введення енергії у культуральну рідину і ця класифікація орієнтована на виробництво продукту.

К. Шюгерль в 1982 р запропонував підрозділити біореактори на 3 основних групи згідно способу введення енергії для перемішування і диспергування стерильного (очищеного) повітря (рис. 5.1.1.).

Запропонована класифікація орієнтована на аеробні процеси, як найбільш поширені в біотехнології і вибір враховує інтенсивність масопередачі кисню у вигляді об'ємного коефіцієнту масопередачі. Представлена система класифікації враховує ефекти, що виникають при введенні визначеної кількості енергії. Базовим ефектом є швидкість сорбції кисню (K_L а (K_v а). [$\text{кгO}_2 / \text{м}^3 \text{ год}$]).[55]

Висновки з представленої схеми:

1. Для ферментерів 1 групи $K_v \text{ а} \leq 4,0-4,5$. Ферментери з введенням енергії газовою фазою придатні для культивування бактерій та дріжджів;
2. Для ферментерів 2 групи $K_v \text{ а} \geq 5,0-6,0$, максимальний рівень турбогіпобіозу;
3. Для ферментерів 3 групи $K_v \text{ а}$ може приймати будь-яке значення, але ці апарати як правило використовують для процесів де потрібний мінімальний рівень турбогіпобіозу.



Рис. 5.1.1. Класифікація ферментерів для аеробних процесів біосинтезу за типом введення енергії на перемішування [55]

Ферментери з підводом енергії газовою фазою поділяються на (рис 5.1.2.):

- а) Ферментер барботажний;
- б) Ферментер барботажний колонний;
- в) Ферментер барботажний ерліфтний;
- г) Ферментер газліфтний колонний;
- д) Ферментер газліфтий петльовий колонний;
- е) Ферментер газліфтий рециркуляційний колонний;
- ж) Ферментер тарілчастий колонний;
- з) Ферментер з плаваючою насадкою колонний;
- и) Ферментер трубчастий. [52]

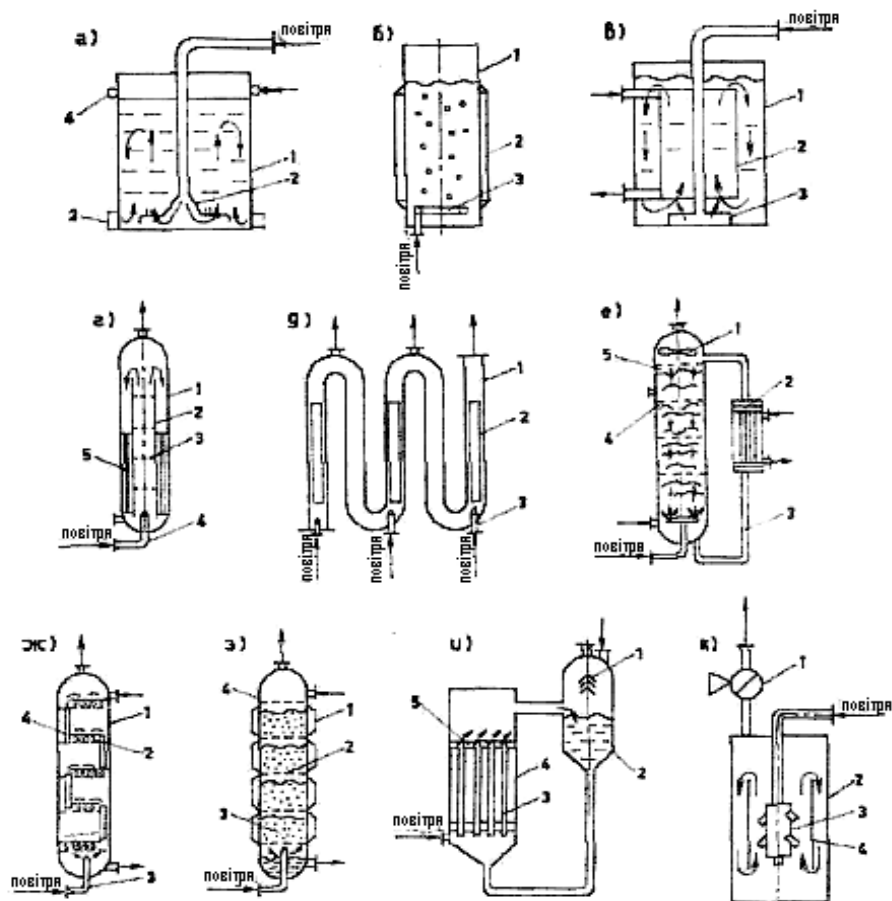


Рис. 5.1.2 Ферментери з підводом енергії газовою фазою [52]

До ферментерів з введенням енергії рідкою фазою відносяться (рис. 5.1.3.):

- а) Одновальний ферментер із самозасмоктуючою мішалкою;
- б) Ферментер із самозасмоктуючими мішалками багатовальний;
- в) Ферментер із самозасмоктуючими мішалками багатовальний з зовнішнім циркуляційним контуром;
- г) Ферментер ежекційний;
- д) Ферментер струменевий з затопленим струменем;
- е) Ферментер струменевий з падаючим струменем.[52]

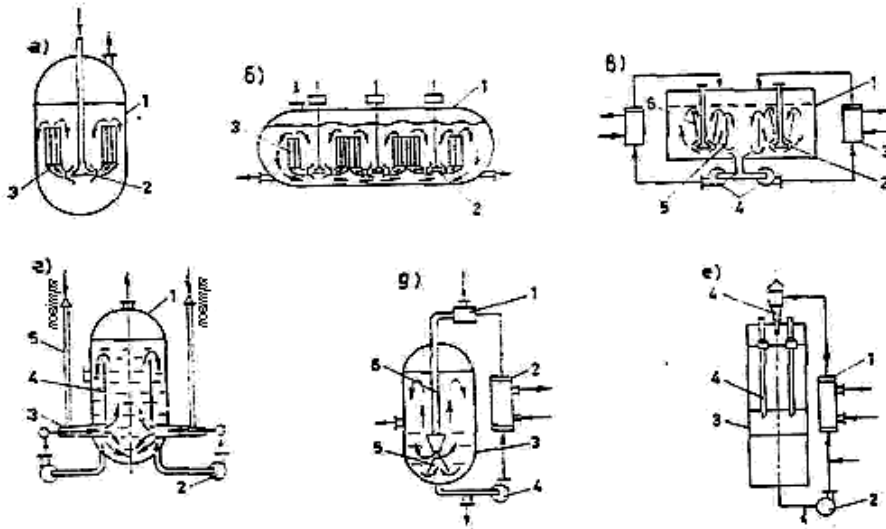


Рис. 5.1.3. Ферментери з підводом енергії рідкою фазою [52]

Ферментери з комбінованим введенням енергії є найбільш застосовуваними на стадії біосинтезу. Даний тип ферментерів має ряд переваг, а саме те, що вони є досить мобільними, в них можна створити будь-який гідродинамічний режим, який буде оптимальний для культивування продуцента. Це все відбувається за рахунок зміни швидкості обертання мішалки. Тому основним елементом даного ферментеру є мішалка, яка забезпечує високий рівень диспергації газової фази та гомогенності фаз. Ферментери даної групи частіше застосовують у асептичних виробництвах, так як забезпечити герметизацію дуже легко. Вони використовуються для отримання посівного матеріалу і для проведення виробничого культивування.[47]

Тому для культивування клітин *E. coli JM109/pHINS05* найбільше підходить ферментер з подачею енергії газовою та рідинною фазами. Так як культивування інсуліну потребує високої інтенсивності розчинення кисню, то буде доцільним використання ферментера з мішалкою та барботером (рис. 5.1.4.).

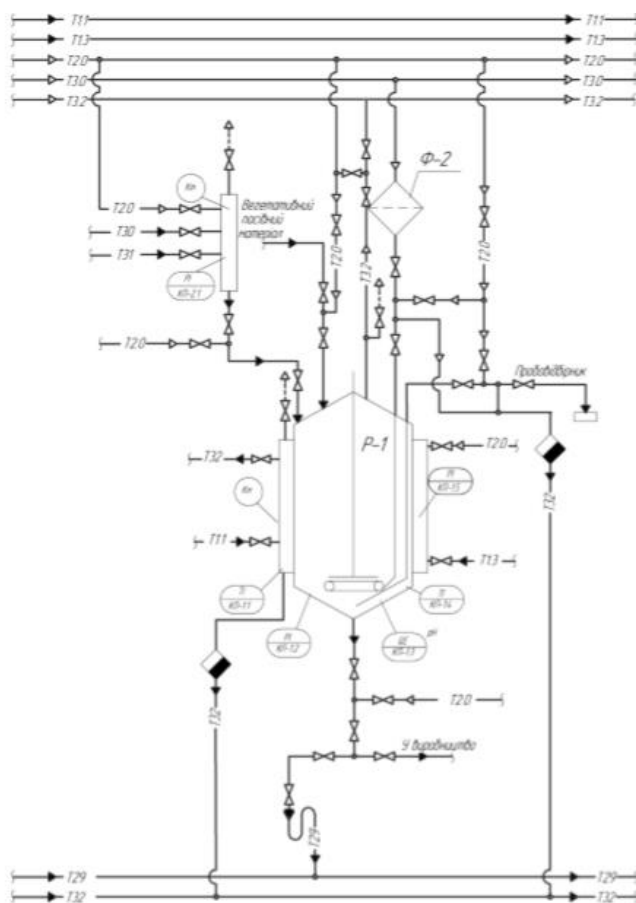


Рис. 5.1.4. Приклад апаратурного оформлення ферментеру з комбінованим введенням енергії [58]

Конструктивно апарат має циліндричний корпус з еліптичним днищем, в верхній частині розташований люк, оглядові вікна, штуцера підведення поживного середовища та посівного матеріалу, аератор, вихід відпрацьованого повітря та пробовідбірник. Більшість апаратів виготовляють з нержавіючої сталі, тому було обрано сталь 12Х18Н10Т. Стерилізацію ферментера проводять насиченою водяною парою з надлишковим тиском 0,3 МПа ($t = 142,9^{\circ}\text{C}$).[56]

Щоб забезпечити підтримку температури під час культивування ферментер забезпечується теплообмінними сорочками, які виготовляються гладкими і повторюють форму апарату. Приводом мішалки слугує електродвигун, який безпосередньо з'єднаний з валом мішалки. Вибір мішалки на пряму залежить від в'язкості середовища. Так як поживне середовище, яке використовується в даній

технології не є дуже в'язким, тому доцільно буде використовувати відкриту турбінну мішалку. Для введення газів використовується барботер, який встановлюється у днищі під мішалкою і являю собою вигнуту трубу. Отвори барботера невеликі, близько 5 мм, щоб уникнути забивку і застою рідини. Герметизація апарату здійснюється за допомогою торцевих ущільнень. [57]

5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

5.2.1. Конструктивний розрахунок ферментера

Розрахунок проводиться за методикою Ружинська Л.І. «Проектування реакторів біотехнологічних та фармацевтичних виробництв» [57].

Номінальний об'єм апарата:

$$V_H = \frac{V_p}{K_3} = \frac{0,1}{0,7} = 0,1428 \quad \text{м}^3$$

Вибираємо стандартний реактор об'ємом $V_H = 0,16 \text{ м}^3$

Приймаємо діаметр ферментера:

$$D = 600 \text{ мм}$$

Площа поверхні теплообміну сорочки:

$$F_T = 0,9 \text{ м}^2$$

Розміри мішалок знаходимо з співвідношень:

$$\frac{D}{d_m} = \frac{3}{4}$$

Обираємо стандартну відкриту турбінну мішалку:

$$d_M = 200 \text{ мм}$$

Співвідношення:

$$\frac{D}{d_m} = \frac{600}{200} = 3$$

Відстань від дна реактора до мішалки

$$h_1 = 0,4 \cdot d_M = 0,4 \cdot 0,2 = 0,08 \text{ м}$$

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		87

Приймаємо

$$h_m = 0,2 \cdot d_M = 0,2 \cdot 0,08 = 16 \text{ мм}$$

Довжина лопатей:

$$l = 0,25 d_M = 0,25 \cdot 200 = 50 \text{ мм}$$

$$b = 0,1 d_M = 0,1 \cdot 200 = 20 \text{ мм}$$

Знаходимо решту конструктивних розмірів днища апарату ГОСТ 6533-78 [59]:

- відбортовка $h_1 = 40 \text{ мм}$;
- внутрішня поверхня $F_{\text{дн}} = 0,47 \text{ м}^2$;
- об'єм $V_{\text{дн}} = 39,5 \cdot 10^{-3} \text{ м}^3$;
- висота днища $h_{\text{дн}} = 150 \text{ мм}$.

Знаходимо висоту циліндричної частини апарату:

$$H_u = \frac{V_n - 2V_{\text{дн}}}{0,785D^2} = \frac{0,16 - 2 \cdot 39,5 \cdot 10^{-3}}{0,785 \cdot 0,6^2} = 0,286 \text{ м}$$

Знаходимо висоту рідини в апараті:

$$H_p = \frac{4(V_p - V_{\text{дн}})}{\pi D} + h_1 + h_{\text{в}} = \frac{4(0,1 - 39,5 \cdot 10^{-3})}{3,14 \cdot 0,6} + 0,15 + 0,04 = 0,318 \text{ м}$$

Відстань від дна до верхньої точки мішалки:

$$h_3 = h_1 + h_m = 0,04 + 0,016 = 0,056 \text{ м.}$$

5.2.2. Розрахунок перемішуючих пристроїв

Розрахунок проводиться за методикою Ружинська Л.І. «Проектування реакторів біотехнологічних та фармацевтичних виробництв» [57].

Визначаємо критерій Рейнольдса:

$$\text{Re} = \frac{nd_m^2}{\nu_c} = \frac{3 \cdot 0,2^2}{8,9 \cdot 10^{-7}} = 1,3 \cdot 10^5, \text{ де}$$

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		88

$$\nu_c = \frac{\mu_c}{\rho_c} = \frac{0,9 \cdot 10^{-3}}{1010} = 8,9 \cdot 10^{-7} \text{ м}^2/\text{с} - \text{коефіцієнт кінематичної в'язкості}$$

В'язкість середовища: $\mu_c = 0,9 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$

Густина середовища: $\rho_c = 1010 \text{ кг/м}^3$

Для турбінної мішалки за графіком знаходимо $K_N = 6$.

Потужність, що витрачається на перемішування:

$$N = K_N \cdot \rho_p \cdot n^3 \cdot d_M^5 = 6 \cdot 1150 \cdot 27 \cdot 0,00032 = 60 \text{ Вт}$$

Для ущільнення валу мішалки обираємо торцьове ущільнення.

Потужність, що витрачається на тертя в ущільненні:

$$N_{ущ} = 6020 d_g^{1,3} = 6020 \cdot 0,02^{1,3} = 37,2 \text{ Вт}$$

діаметр валу $d_v = C \cdot d_M = 0,117 \cdot 0,2 = 0,02 \text{ м}$

В ферментері встановлені гільзи для термопари:

$$K_1 = 1,1$$

Коефіцієнт рівня рідини:

$$K_H = \sqrt{\frac{H_p}{D}} = \sqrt{\frac{0,318}{0,6}} = 0,728$$

Коефіцієнт, що враховує наявність перегородок:

$$K_n = 1.$$

Потужність електродвигуна:

$$N_{ел} = \frac{K_n K_H \cdot \sum K_1 \cdot N_p + N_{ущ}}{\eta} = \frac{1 \cdot 0,728 \cdot 1,1 \cdot 60 + 37,2}{0,85} = 2102 \text{ Вт}$$

Обираємо двигун з номінальною потужністю $N_H = 3 \text{ кВт}$. Маркування АИР 100S4.

5.2.3. Розрахунок воронки

Параметр висоти завантаження апарата ферментера:

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		89

$$\gamma = 8 \frac{H_p}{D} + 1 = 8 \frac{0,318}{0,6} + 1 = 5,24$$

Параметр гідравлічного опору мішалки:

$$E = \frac{\gamma}{\xi_m z_M R_{eq}^{0,25}} = \frac{5,24}{8,4 \cdot 1 \cdot (1,3 \cdot 10^5)^{0,25}} = 0,033$$

за графіком знаходимо $\psi_1 = 1,2$ та $B = 6$.

Глибина воронки:

$$h_B = \frac{B n^2 d_M^2}{2} = \frac{6 \cdot 3^2 \cdot 0,2^2}{2} = 1,08 \text{ м}$$

Гранично допустима глибина воронки:

$$h_{cp} = H_p - h = 0,318 - 0,08 = 0,238 \text{ м}$$

$h_B = 1,08 > h_{cp} = 0,238$ – в апараті потрібно встановлювати відбивні перегородки.

5.2.4. Розрахунок барботера

Розрахунок проводиться за методикою Соколов В.Н. «Машины и аппараты химических производств» [62]

Апарат діаметром 600 мм, висота рівня рідини 0,318 м, діаметр мішалки 200 мм.

Прийmemo приведену швидкість кисню в апараті $\omega_p = 0,04$ м/с, отримаємо його витрату:

$$V_p = (3,14 / 0,16) \cdot 0,6^2 \cdot 0,04 = 0,028 \text{ м}^3/\text{с}$$

Діаметр труби барботера при швидкості газу в ній $\omega_6 = 25$ м/с буде:

$$d_6 = \sqrt{\frac{4V_p}{\pi \omega_6}} = \sqrt{\frac{0,028}{0,785 \cdot 25}} = 0,037 \text{ м}$$

Середній діаметр барботеру:

$$D_{cp} = 1,75 d_m = 1,75 \cdot 200 = 350 \text{ мм}$$

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
						90
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

Густина повітря при температурі $t = 35^{\circ}\text{C}$ і абсолютному тиску

$$p = 0,1 + p_{\text{наб}} + H_{\text{жс}} \rho_{\text{жс}} g \cdot 10^{-6} = 0,1 + 0,05 + 1 \cdot 1000 \cdot 9,81 \cdot 10^{-6} = 0,161 \text{ МПа}$$

буде $\rho_r = \rho p T / (\rho T) = 1,29 \cdot (0,161 \cdot 273) / (0,1 \cdot 308) = 1,84 \text{ кг/м}^3$

Швидкість газу в отворах барботеру

$$\omega_0 = 3,4 \sqrt{\frac{0,037 \cdot 1000}{1,84}} = 4,4 \text{ м/с}$$

Приймемо діаметр отворів в барботері $d_0 = 5 \text{ мм}$, тоді їх загальна кількість буде

$$z_0 = \frac{4V_p}{\pi d^2 \omega_0} = \frac{0,028}{0,785 \cdot 0,005^2 \cdot 4,4} = 204$$

Якщо всі отвори розмістити по колу діаметра $D_{\text{ср}}$ в два ряди, то крок їх розташування буде

$$t = \pi D_{\text{ср}} (2 / z_0) = 3,14 \cdot 350 \cdot (2 / 204) = 10,77 \text{ мм}$$

Крок розміщення отворів в цьому ряду $t_2 = 3,14 \cdot 175 / 102 = 5,3 \text{ мм}$

5.2.5. Тепловий розрахунок

Розрахунок проводиться за методикою Колосков С. П. «Оборудование ферментной промышленности» [60]

Погодинна кількість виділення тепла культурою:

$$Q_q = \frac{30 \cdot 15670 \cdot 10^3}{3600 \cdot 24} = 5,44 \cdot 10^3 \text{ Вт}$$

15670 кДж/кг – тепловиділення цукру

30 кг – кількість цукру в середовищі

Тепловий баланс ферментера:

$$Q_q = Q_{\text{вод}} + Q_5$$

Втрати на тепловипромінювання в навколишнє середовище приймаємо 2% від

$$Q_q: \quad Q_5 = 0,02 \cdot 54,4 \cdot 10^2 = 1,088 \cdot 10^2 \text{ Вт}$$

Тепло, що відводиться водою:

$$Q_{\text{вод}} = Q_q - Q_5 = 5,44 \cdot 10^2 - 1,088 \cdot 10^2 = 4,352 \cdot 10^2 \text{ Вт}$$

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		91

Розхід води для відводу тепла:

$$G_{\text{вод}} = \frac{Q_{\text{вод}}}{c(t_2 - t_1)} = \frac{435}{4186(22 - 15)} = 0,014 \text{ кг/с}$$

$t_1 = 15^\circ\text{C}$ – температура води при вході в сорочку

$t_2 = 22^\circ\text{C}$ – температура води при виході з сорочки

Споживча поверхня охолодження ферментера:

$$F = \frac{Q_{\text{вод}}}{k\Delta t_{cp}}$$

$$\Delta t_{\delta} = 30 - 15 = 15^\circ\text{C}$$

$$\Delta t_m = 30 - 22 = 8^\circ\text{C}$$

$$\Delta t_{\delta} / \Delta t_m = 15 / 8 < 2$$

Для даного випадку середня різниця температур теплоносіїв:

$$\Delta t_{cp} = \frac{\Delta t_{\delta} + \Delta t_m}{2} = \frac{15 + 8}{2} = 11,5^\circ\text{C}$$

Для апаратів з сорочками з перемішуванням мішалкою коефіцієнт тепловіддачі від перемішуючої рідини до стінки визначають за рівнянням:

$$Nu_c = 0,36 Re^{0,67} Pr^{0,33} (\mu / \mu_{st})^{0,14}$$

Критерій Нуссельта, що характеризує інтенсивність тепловіддачі на границі потік

– стінка:

$$Nu_c = \alpha_1 D_{\text{вн}} / \lambda$$

Для примусового перемішування мішалкою критерій Рейнольдса:

$$Re = \frac{p n d^3}{\mu}$$

Прирівнюємо формули критерія Нуссельта:

$$\alpha_1 D_{\text{вн}} / \lambda = 0,36 \left(\frac{p n d^3}{\mu} \right)^{0,67} \left(\frac{3600 c_p \mu g}{\lambda} \right)^{0,33} (\mu / \mu_{st})^{0,14}$$

звідси коефіцієнт тепловіддачі від перемішуючої рідини до стінки:

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		92

$$\alpha_1 = 0,36 \frac{\lambda}{D_{\text{вн}}} \left(\frac{p n d^3}{\mu} \right)^{0,67} \left(\frac{3600 c_p \mu g}{\lambda} \right)^{0,33} \left(\frac{\mu}{\mu_{\text{сн}}} \right)^{0,14}$$

$$\alpha_1 = 0,36 \frac{0,6}{0,6} \left(\frac{1010 \cdot 3 \cdot 0,2^2}{0,0009} \right)^{0,67} \left(\frac{4186 \cdot 0,0009}{0,6} \right)^{0,33} \left(\frac{0,0009}{0,0009} \right)^{0,14} = 1800 \text{ Вт/м}^2 \cdot ^\circ\text{C}$$

В'язкість середовища: $\mu = 0,9 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$

Густина середовища: $\rho_c = 1010 \text{ кг/м}^3$

Питома теплоємність середовища: $c_c = 4186 \text{ Дж/кг} \cdot ^\circ\text{C}$

Теплопровідність середовища: $\lambda = 0,6 \text{ Вт/м} \cdot ^\circ\text{C}$

Внутрішній діаметр ферментеру: $D_{\text{вн}} = 0,6 \text{ м}$

Діаметр мішалки: $d_m = 0,2 \text{ м}$

Число обертів мішалки: $n = 3$

Коефіцієнт тепловіддачі від стінки ферментеру до охолоджуючої води визначаємо за формулою:

$$\alpha_2 = 0,023 \frac{\lambda}{D_3} \left(\frac{D_{\text{вн.р}}}{D_{\text{вн.р}} - D_3} \right)^{0,45} \left(\frac{\omega_p D_3 \rho}{\mu} \right)^{0,8} \left(\frac{3600 \mu c g}{\lambda} \right)^{0,43}$$

$$\alpha_2 = 0,023 \frac{0,582}{0,6} \left(\frac{0,63}{0,63 - 0,6} \right)^{0,45} \left(\frac{0,23 \cdot 0,6 \cdot 0,999}{0,00108} \right)^{0,8} \left(\frac{0,00108 \cdot 4160}{0,582} \right)^{0,43} = 312 \text{ Вт/м}^2 \cdot ^\circ\text{C}$$

Коефіцієнт теплопровідності води $\lambda = 0,584 \text{ Вт/м} \cdot ^\circ\text{C}$.

Зовнішній діаметр корпусу ферментеру $D_3 = 0,6 \text{ м}$

Внутрішній діаметр сорочки ферментеру $D_{\text{вн.р}} = 0,63 \text{ м}$

Швидкість води в сорочці ферментеру:

$$\omega_g = \frac{G_n}{3600 f p} = \frac{24,5}{3600 \cdot 0,785 (0,63^2 - 0,6^2) 0,999} = 0,23 \text{ м/с}$$

Площа січення сорочки $f = 0,785 (D_{\text{вн.р}}^2 - D_3^2)$

Густина води при $17,5^\circ\text{C}$ $\rho = 0,999 \text{ т/м}^3$

Теплофізичні параметри води прийняті при середній температурі:

$$t_{cp}=(15+22)/2=17,5\text{ }^{\circ}\text{C}$$

Коефіцієнт теплопередачі від охолоджуємої рідини до охолоджуючої води:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_1} + \frac{S}{\lambda} + \frac{1}{\alpha_2}} = \frac{1}{\frac{1}{1800} + \frac{0,01}{58,15} + \frac{1}{312}} = 256 \text{ Вт/м}^2 \cdot ^{\circ}\text{C}$$

Товщина стінки ферментеру: $S=0,01$ м

Коефіцієнт тепловіддачі стінки ферментеру: $\lambda=58,15$ Вт/м $\cdot^{\circ}\text{C}$.

Забруднення стінок відкладами в процесі експлуатації призводить до погіршення коефіцієнта теплопередачі, тому для розрахунку взяли:

$$k=485 \cdot 1,163=564 \text{ Вт/м} \cdot ^{\circ}\text{C}.$$

Площа поверхні охолодження рубашки:

$$F = \frac{Q_{вод}}{k \Delta t_{cp}} = \frac{435}{564 \cdot 11,5} = 0,6 \text{ м}^2$$

5.3. Вибір загальнозаводського обладнання

При культивуванні мікроорганізмів, а саме при виробництві інсуліну, дуже важливо здійснювати допоміжні роботи. Це впливає на ефективність всього виробництва і на відсутність контамінантів у цільовому продукті. Основною допоміжною роботою на фармацевтичному виробництві є підготовка повітря. Навіть незначний вміст сторонньої мікрофлори в повітрі може привести до інфікування поживного середовища і різкого зниження виходу продукту, так як при багатодобовому циклі культивування продуцента споживається повітря 50-80 тис. м³/год. [51]

Як правило в біотехнології питання технологічного повітря асоціюються з його функціями при біосинтезі. Технологічне аераційне повітря є джерелом лімітуючого субстрату – кисню і є джерелом енергії при перемішуванні культуральної рідини. В загальному виді процеси, що призводять до захоплення

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
						94
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

частинок при фільтрації, діляться на ситові (з осадженням частинок при прямому дотику, якщо розмір просвіту менше діаметра частки) і неситові, до яких відносяться інерційне осадження, дифузія, а також електростатичне тяжіння.

Одним з критичних параметрів біосинтезу є концентрація розчиненого кисню. Для кожного БА існує так звана критична концентрація розчиненого кисню. Для *E. coli* складає 0,0082 ммоль/л при 38°C, для *Penicillium* при 24°C - 0,022 ммоль/л, для *Saccharomyces cerevisiae* при 20°C - 0,0037 ммоль/л.

Фільтри тонкої (фільтри стерилізації, індивідуальні фільтри) необхідні для уловлювання основної маса біологічних забруднень пропущених іншими фільтрами, а також всіх інших можливих забруднень, що потрапили в систему випадково. Назва індивідуальний фільтр обумовлена тим, що вони встановлюються безпосередньо перед входом аераційного повітря у ферментер. Їх часто називають фільтрами термінальної очистки. [56]

Найбільше розповсюдження для очистки і стерилізації повітря знаходять конструкції в яких використовуються змінні (картриджні) готові стандартні фільтруючі патрони. Марку фільтра вибирають в залежності від продуктивності ферментера. В патронних фільтрах можуть бути використані папір з базальтових супертонких волокон, гофрований базальтовий картон і різні фторопластові елементи. Фільтри тонкої очистки практично забезпечують 100% очистку і стерилізацію повітря. Вони стерилізуються гострою парою в технологічній обв'язці з ферментером без видалення фільтруючих елементів з корпусу фільтра. Цей метод створює дуже жорсткі умови для вибору фільтруючих матеріалів, так як через фільтр під тиском пропускається велика кількість гострої пари, часто забрудненої і з великим вмістом конденсату. Тому більш раціональна двостороння стерилізація фільтрів парою. Пара повинна поступати чиста і суха температурою 120°C при стабілізованому тиску. Час стерилізації коливається від 30 до 60 хв в залежності від типу фільтруючого матеріалу. [56]

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		95

Фільтри з тканиною Петрянова-Соколова з успіхом використовують для тонкої бактеріальної очистки повітря. Тканина Петрянова представляє собою надтонкі, хаотично сплетені в виді полотен на марлевій або іншій поруватій основі волокна товщиною 1,5 і 2,5 мкм з перхлорвінілу (ФПП-15 і ФПП-25), ацетатцелюлози (ФПА-15), полістиролу (ФПС-15), поліфторстиролу (ФПФС). [52]

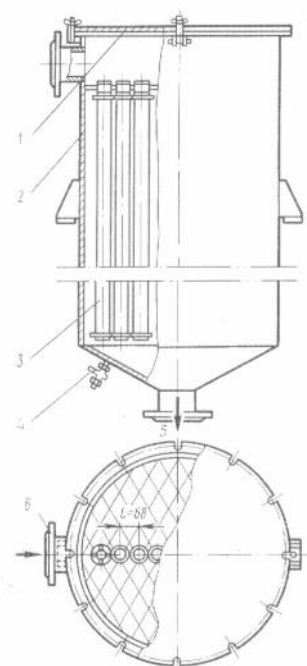


Рис. 5.3.1 Фільтр з тканиною Петрянова [52]

1 – кришка, 2 – корпус, 3 – стакан, 4 – кран для підводу парів формаліну, 5 – штуцер для виходу повітря, 6 – штуцер для входу повітря

Обираємо індивідуальний фільтр ДУ-200 з фільтруючим матеріалом ФПП-15, ФПА-15 з продуктивністю 0,28 м³/с.

Система очистки відпрацьованого повітря дуже важлива на виробництві, так як з ферментера разом з повітрям в атмосферу викидається до 10¹⁰-10¹¹ клітин мікроорганізмів і спор в 1 м³, що недопустимо з точки зору охорони навколишнього середовища. Очистка відпрацьованого повітря ускладнюється

тим, що воно має дуже високу відносну вологість і звичайні фільтри тонкої очистки швидко псуються.

Для очистки відпрацьованого повітря можна використовувати волого і термостійкі фільтри фірм “Палл” (ФРГ) або “Балстон”. [61]

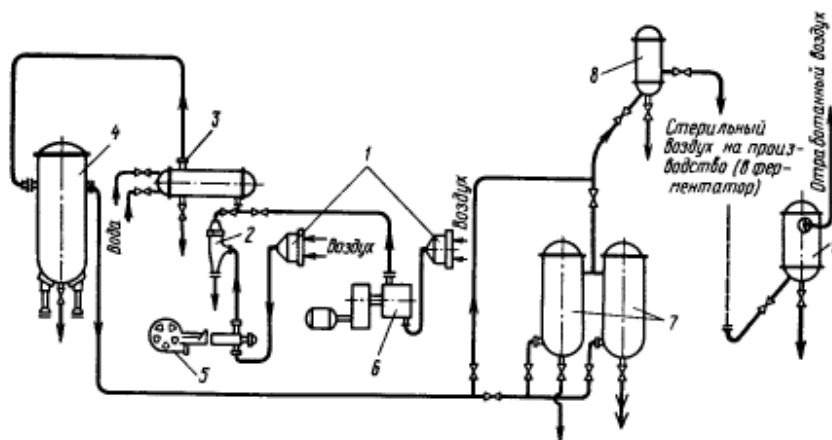


Рис. 5.3.2. Схема очистки і стерилізації повітря для глибинного культивування продуцентів [61]:

1 – вісцинові фільтри, 2 – масловіддільник, 3 – холодильник, 4 – ресивер, 5 – поршневий компресор, 6 – турбокомпресор, 7 – головні фільтри, 8 – індивідуальний фільтр, 9 – фільтр для відпрацьованого повітря.

Для доочищення повітря використовують скрубери Вентури, які є достатньо ефективними та економічно вигідними.

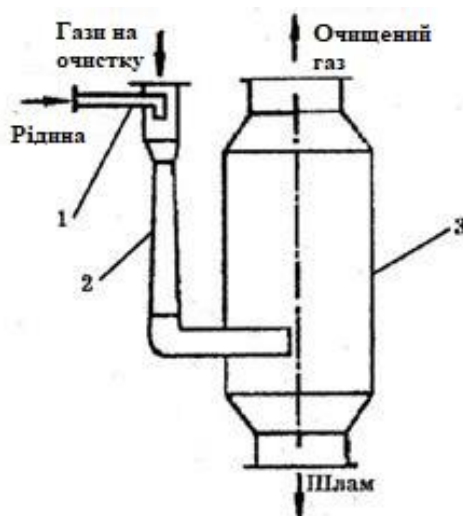


Рис. 5.3.3. Скруббер Вентури [55]

1 – зрошуюча форсунка, 2 – труба Вентури, 3 – каплеуловлювач

Принцип роботи скрубера заснований на аеродинамічній силі труби Вентури. Вона являє собою трубу, схожу на пісочний годинник. Труба включає в себе: дифузор, горловину, конфузор і штуцера підведення зрошувальної рідини з форсунками. Принцип роботи доволі простий. Через фланець вхідного газу в трубу Вентури потрапляє забруднений газ. У трубі газ розганяється до великих швидкостей відповідно до закону Бернуллі. Зверху, через форсунки надходить вода. За рахунок утворення турбулентності, вода в трубі дробиться на більш дрібні краплі. За рахунок дроблення збільшується площа зіткнення води з газом, тобто площа фільтрації. Таким чином відбувається уловлювання забруднень водою або спеціальною рідиною. Потім вода з газом проходить по газоходу в відцентровий каплеуловлювач. У ньому вода з газом опускається вниз, а чисте повітря за допомогою вентилятора виходить назовні. [55] Обираємо скруббер СВ-Кк-2-0,220-01 з продуктивністю 120-180 м³/год

5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

Проектування, будівництво і реконструкція підприємств згідно правил безпеки проводиться у відповідності із будівельними нормами і правилами (СНіП).

Коли розміщують обладнання у приміщеннях дотримуються безпеки, зручність обслуговування, а також на випадок проведення ремонту. Обов'язково між обладнанням має бути прохід не менше 2 м, а якщо для апарату треба перевірку або огляд, то тоді 0,8 м. Робоче місце має бути добре освітлене. Відповідальність за дотримання правил охорони праці покладається на безпосередніх керівників підрозділів, а в цілому по підприємству відповідальність несуть директор та головний інженер.[47]

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
						98
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

Робітники мають обов'язково проходити інструктаж по охороні праці (вступний або повторний кожні пів року), а якщо до обладнання пред'являються підвищені вимоги, то робітники проходять спеціальне навчання і здають екзамен. Для забезпечення охорони праці і мікробіологічній промисловості застосовують індивідуальні засоби захисту. Якщо робітник працює з агресивними реагентами, то крім рукавиць рекомендують використовувати захисні мазі. [47]

Щодо апаратів, які використовуються при виробництві інсуліну, а саме висуваються вимоги безпеки до ферментеру: він повинен мати витяжні труби, переріз яких має забезпечувати видалення повітря, відбір проб має проводитися так, щоб виключити можливість контакту персоналу та культуральної рідини, всі речовини мають завантажуватися у ферментер за допомогою спеціальних ліній подачі, ферментер має бути оснащений контрольно-вимірювальними приладами: термометрами, манометрами, витратомірами, контролю рівня рідини. Ферментер, його компоненти і для вимірювань, і управління можна використовувати тільки в запропонованих умовах (зокрема, при певній температурі і характеристиках навколишнього середовища). [47]

Склад повітря робочої зони нормується за ГОСТ 12.1.005-88. ССБТ.

Наименование вещества	ПДК в воздухе рабочей зоны, мг/м ³	Наименование вещества	ПДК в воздухе рабочей зоны, мг/м ³
1. Аммиак	20	13. Ртуть металлическая	0,01
2. Ацетон	200	14. Серная кислота	1
3. Бензин — растворитель	300	15. Соляная кислота	5
4. Дрожжи кормовые	6	16. Суперфосфат	6
5. Гидроксид натрия	0,5	17. Углеводороды	300
6. Известь негашеная	6	18. Уксусная кислота	5
7. Изопропиловый спирт	3	19. Формалин (по формаль- дегиду)	0,5
8. Лигнин	6	20. Фурфурол	10
9. Метиловый спирт	5	21. Четыреххлористый уг- лерод	20
10. Озон	0,1	22. Этиловый спирт	1000
11. Окислы азота	5		
12. Пыль стеклянного и минерального волокна	3		

Рис. 5.4.1. Гранично допустимі концентрації (ГДК) деяких речовин в робочій зоні [47]

Відповідно до ГОСТ 24444-87 герметичність апарату забезпечується за допомогою торцевого ущільнення та надійного електрозварювання частин апарату. Також апарат має бути обладнаний захисним заземленням згідно з ГОСТ 12.1.038-82. Мікроклімат на виробництві нормується за ДСН 3.3.6.042-99 Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень. Природне та штучне освітлення нормується за ДБН В.2 5-10.2006 Природне і штучне освітлення. Норми проектування. Загальні санітарно-гігієнічні вимоги до повітря робочої зони. Допустимі рівні шуму на робочих місцях регламентуються за ГОСТ 12.1.00383 Шум. Загальні вимоги безпеки.

Стічні води можуть спускатися у каналізацію тільки у відповідності до санітарних правил та норм. Перед тим, як викинути стічні води в каналізацію, їх треба спочатку очистити, щоб вилучити і регенерувати цінні продукти. Тверді відходи збирають, а потім відправляють на полігон побутових відходів. [63]

					ДП 6113. 00.000 ПЗ	Арк.
						100
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

ВИСНОВКИ

1. В проекті для виробництва інсуліну рекомбінантного у картриджах було обрано продуцент *E. coli* JM109 з плазмідною рHINS05, проаналізовано отримання даного штаму за допомогою генної інженерії.
2. Запропонована технологія з оптимальними параметрами культивування посівного матеріалу, яка забезпечує високий вихід *E.coli* (3-3,5 кг за зміну) та підвищений вміст інсуліну в тільцях включення, а також чистоту продукту 98-99%.
3. Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості продуценту *E. coli* JM109/рHINS05 обрано склад поживного середовища для виробничого біосинтезу на основі гідролізату казеїну (30 г/л), глюкози (30 г/л), пекарських дріжджів (14 г/л) та фосфату калію (3,5 г/л).
4. Відповідно до визначених фізико-хімічних та біологічних характеристик продукту для підготовки посівного матеріалу було обрано та розраховано ферментер об'ємом 0,16 м³ (габаритні розміри: 1480x820x665 мм) з відкритою турбінною мішалкою з потужністю двигуна 3 кВт та барботером, що дозволяє отримати цільовий продукт належної якості. Продуктивність ферментеру 4,125 кг/м³·год, має циліндричний корпус з привареними до нього еліптичними днищем та кришкою.
5. У відповідності до вимог до готової форми та якості продукту розроблено технологічну і апаратурну схеми виробництва інсуліну рекомбінантного у картриджах по 3мл та у флаконах по 5 мл.

					ДП 6113. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Лемішко Ю.К.				ВИСНОВКИ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.							101	
						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівник	Карпенко Ю.В.							
Затверд.								